

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

فصلنامه علمی - پژوهشی

زیست شناسی تکوینی

سال شانزدهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۳

صاحب امتیاز: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال (معاونت پژوهشی)

سردبیر: دکتر احمد مجد

مدیر مسئول: دکتر صدیقه اربابیان

مدیر داخلی: دکتر گلناز تجدد

هیات تحریریه:

دکتر احمد مجد	استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
دکتر محمد نبیونی	دانشیار دانشگاه خوارزمی
دکتر کاظم پرپور	استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
دکتر فرخنده رضائزاد	دانشیار دانشگاه شهید باهنر کرمان
دکتر صدیقه مهرابیان	استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
دکتر یوسف سیدنا	دانشیار دانشگاه شهید بهشتی
دکتر مهدی رهنما	دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
دکتر صدیقه اربابیان	دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
دکتر علیرضا ایرانبخش	استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
دکتر سید محمد مهدی حمدی	دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

تأییدیه درجه علمی

بر اساس آیین نامه تعیین اعتبار علمی نشریات وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، نشریه زیست‌شناسی تکوینی وابسته به دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال در جلسه کمیسیون بررسی نشریات علمی مورخ ۹۵/۱۰/۲۶ به شماره ۳/۱۸/۲۳۷۰۹۵ موفق به اخذ تأییدیه‌ی علمی پژوهشی گردید و همچنین دارای مجوز انتشار شماره ۲۱۰۹۰ مورخ ۸۸/۰۹/۳۰ از وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی می‌باشد.

ویراستاران: دکتر احمد مجد، دکتر صدیقه اربابیان، دکتر گلناز تجدد

طراحی و صفحه‌آرایی: دکتر صدیقه اربابیان

آدرس: میدان هروی، مکران جنوبی، خیابان بوستان دهم، دانشکده علوم زیستی

کد پستی: ۱۶۶۷۹۱۴۱۶۱

تلفکس: ۲۲۹۴۹۷۹۲

- پست الکترونیک فصلنامه

- آدرس الکترونیک فصلنامه

jdb@iau-tnb.ac.ir

jdb.iau-tnb.ac.ir

راهنمای نگارش و ارسال مقاله برای فصلنامه

«زیست شناسی تکوینی»

- نویسندگان محترم تقاضا می شود در هنگام ارسال مقالات به نکات زیر توجه فرمایند:
- ۱- مقاله در مجله دیگری به چاپ نرسیده یا به طور همزمان برای سایر مجلات ارسال نشده باشد.
 - ۲- مقاله پژوهشی حاصل تحقیق نویسندگان باشد. مقالات مروری نیز از اشخاص مجرب، با بصیرت و با ارجاع به تعداد قابل قبولی از مقالات منتشر شده توسط نویسندگان پذیرفته می شود.
 - ۳- مقاله ارسالی حداقل ۵ صفحه و حداکثر ۱۵ صفحه و مشتمل بر عنوان فارسی و انگلیسی، چکیده ی فارسی و انگلیسی، کلمات کلیدی فارسی و انگلیسی، مقدمه، مواد و روش کار، نتایج، بحث و منابع باشد. چکیده بیش از ۲۵۰ کلمه نبوده و کلمات کلیدی نیز بین ۴ تا ۷واژه باشد.
 - ۴- به همراه هر مقاله، یک صفحه مجزا شامل عنوان مقاله (فارسی و انگلیسی)، نام و نام خانوادگی نویسندگان (فارسی و انگلیسی)، مرتبه علمی و محل اشتغال آنها و همچنین نشانی، شماره تلفن و فکس محل کار (یا منزل)، تلفن همراه و E-mail و مسئول مکاتبات جهت تسریع در مکاتبات بعدی ذکر شود. ترتیب درج اسامی نویسندگان را باید مشخص نموده و مسئول مکاتبات نیز با علامت ستاره مشخص شود.
 - ۵- مقاله با نرم افزار Word (ترجیحا" 2003) تایپ شده، قلم فارسی آن B Lotus و قلم انگلیسی Times New Roman باشد، فرمت مقاله دو ستونی با حاشیه ۳ سانتی متر از بالا، ۲.۵ سانتی متر از پایین، ۲.۵ سانتی متر از راست و چپ باشد.
 - ۶- عنوان فارسی و انگلیسی مقاله با فونت ۱۴ ، نام نویسندگان با فونت ۱۲، آدرس نویسندگان و چکیده فارسی فونت ۱۱، کلمات کلیدی فارسی فونت ۱۰ و متن مقاله با فونت ۱۲ باشد. تیتراهای داخل متن با
- فونت ۱۲ Bold باشند. چکیده ی انگلیسی، منابع و اصطلاحات انگلیسی با فونت ۱۲ تنظیم گردد.
- ۷- عنوان جداول (فونت ۱۱) در بالای آنها ذکر شده و در صورت نیاز به توضیحات بیشتر، مطالب با فونت ۱۰ در زیر جدول ارائه گردد. به علاوه هر ستون جدول باید دارای عنوان و واحد مربوط به خود باشد. توضیحات مربوط به منحنی ها، تصاویر و نمودارها در زیر آنها با فونت ۱۱ نوشته شود. عکس های ارسالی باید اصل، دارای مقیاس، واضح و دقیق باشند.
- ۸- در انتهای مقاله ابتدا منابع فارسی و سپس انگلیسی به شکل پیوسته و بر اساس حروف الفبای نام خانوادگی نویسنده ی اول شماره گذاری شده و در متن مقاله با شماره و در داخل کروشه ارجاع داده شود. در نگارش منابع موارد زیر رعایت گردد:
- الف - اگر منبع کتاب است:
- نام خانوادگی و حرف اول نام نویسندگان، تاریخ انتشار، عنوان کامل کتاب، شماره چاپ، ناشر، شهر، صفحات. مثال:
- حبیبی، ط. ۱۳۸۱. جانورشناسی عمومی. جلد دوم، چاپ ششم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، صفحات ۱۵۰-۱۴۰ (یا ۶۵۱ صفحه).
- ب - اگر منابع مورد نظر مجله است:
- نام خانوادگی و مخفف نام تمامی نویسندگان، تاریخ انتشار، عنوان مقاله، نام مجله، دوره، شماره، صفحات. مثال:
- Gerendai I., Shaha C., Gunsalus G.L., Bardin C.W. 1986, The effects of opioid receptor antagonists suggest that testicular opiates regulate Sertoli and Leydig cell function in the neonatal rat. *Endocrinology*, 118 (5): 2039-2044.
- ۹- مسئولیت صحت و سقم مطالب به عهده نویسندگان

پست الکترونیک: jdb@iau-tnb.ac.ir
آدرس الکترونیک: jdb.iau-tnb.ac.ir

تلفکس: ۲۲۹۴۹۷۹۲

آدرس پستی: تهران، پاسداران، میدان هروی، خیابان
مکران جنوبی، بوستان دهم، دانشکده‌ی علوم زیستی،
دفتر فصلنامه‌ی زیست شناسی تکوینی

است. ضروری است همراه با مقاله، فتوکپی فرم تعهد
متقابل که در داخل مجله آورده شده است، تکمیل و
ارسال گردد.

۱۰- یک نسخه‌ی اصل از مقاله همراه با نام نویسندگان و
سه نسخه‌ی دیگر بدون نام نویسندگان به دفتر مجله
ارسال گردد.

۱۱- مقالات از طریق الکترونیکی یا پستی به یکی از
آدرس‌های زیر ارسال گردند:

فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال شانزدهم، شماره ۴، (پیاپی ۶۴) پاییز ۱۴۰۳

صفحه	عنوان مقالات
۱	درک مسیرهای مختلف مرگ برنامه ریزی شده سلولی در درمان هدفمند بیماری‌ها امیر آراسته، مرتضی کریم پور، فایزه فلاح، سارا کیانی
۱۳	بررسی اثرات ترمیمی رزمارینیک اسید بر نقیصه تجربی نخاع در مدل حیوانی موش صحرایی نژاد ویستار سید احمد عمادی، هادی نداف، الهام حویزی
۲۳	مروری بر فرآیندهای تولید چرم مبتنی بر میسلایوم قارچ‌ها شهرزاد صادقی امجد، حورا دادگستر، محدثه لاری پور
۳۷	بررسی تغییرات سطح اسفنگوزین و سرامیدها در نمونه‌های الیگوزواسپرمی از مردان نابارور آتنا اکبری، فاطمه قاسمیان
۴۵	اثر سیتوتکسیتی توأم داروهای کپسیتابین و ملاتونین روی رده‌های سلولی HER2 مثبت (SK-BR-3) و HER2 منفی (MCF-7) سرطان پستان انسانی و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز سپیده شایان، لعیا تکبیری اسگوئی، فاطمه جوانی جونی
۵۳	سنتز زیستی، بهینه‌سازی و مشخصه‌یابی نانوذرات طلا توسط عصاره بذر گیاه اسطوخودوس امین باقی زاده، صدیقه زارعی دهرساجی، حسن کریمی مله، محمد علی ابراهیمی
۶۳	مقایسه اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمینوتیک، به صورت مستقیم و غیرمستقیم در نارسایی کلیوی القا شده با ایسکمی حاد قلبی در رت‌های نر نژاد ویستار امیر اکبری آرمنند، مهسا آل ابراهیم، نوشین باریک رو، فاطمه روح الله

مقاله مروری

درک مسیرهای مختلف مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در درمان هدفمند بیماری‌ها

امیر آراسته^{۱*}، مرتضی کریم پور^۱، فایزه فلاح^۲، سارا کیانی^۲

^۱ گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

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

* (نویسنده مسئول مکاتبات): arasteh@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۳

چکیده

ایجاد درمان‌هایی که مرگ کارآمد سلول‌های سرطانی توسط آپوپتوز را تشویق می‌کند، سنگ بنا و هدف انکولوژی بالینی برای بیش از سی سال بوده است. مسیرهای پیام‌رسانی متعددی که به‌عنوان درونی و بیرونی شناخته می‌شوند، در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نقش دارند. این مسیرها توسط محرک‌های مختلفی مانند نظارت بر سیستم ایمنی، آسیب DNA و استرس سلولی فعال می‌شوند. مرگ سلولی همچنین ممکن است تحت تأثیر نحوه تعامل مسیرهای آپوپتوز با سایر فرآیندهای پیام‌رسانی قرار گیرد. مطالعات کشف دارو (با پرداختن به فراهمی زیستی، پایداری، نفوذ تومور، مشخصات سمیت در بافت‌های غیر بدخیم، تداخلات دارویی، و اثرات خارج از هدف) و درک بیولوژی تومور برای ترجمه بالینی عوامل موثر بر آپوپتوز ضروری است. مرگ سلولی تومور با روش‌های درمانی امکان‌پذیر است، اما انتخاب، رشد و پراکندگی سلول‌های مقاوم به درمان در نهایت پتانسیل کشندگی را تعیین می‌کند. هدف از مطالعه حاضر بررسی مسیرهای آپوپتوز اولیه و مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با آن، به همراه بحث در مورد اهداف مولکولی آن‌ها از منظر درمانی بوده است.

کلیدواژه‌ها: آپوپتوز، مسیرهای پیام‌رسانی، کاسپاز، سرطان.

مقدمه

مرگ سلولی یک فرآیند ضروری در رشد، هموستاز بافتی و یکپارچگی موجودات چند سلولی است. تکثیر و حذف سلول برای حفظ فرآیندهای فیزیولوژیکی هموستاز در ارگانیسم بالغ ضروری است. سلول‌های ناخواسته در طی فرآیند دگرگونی، جنین‌زایی، پاتوژنز و همچنین گردش بافت برداشته می‌شوند.

مرگ سلولی معمولاً شامل دو مکانیسم تعریف شده است: مرگ

برنامه‌ریزی شده سلولی^۱ و نکروز^۲ (شکل ۱) [۱, ۲, ۳, ۴].

مرگ سلولی که شامل یک فرآیند برنامه‌ریزی شده ژنتیکی

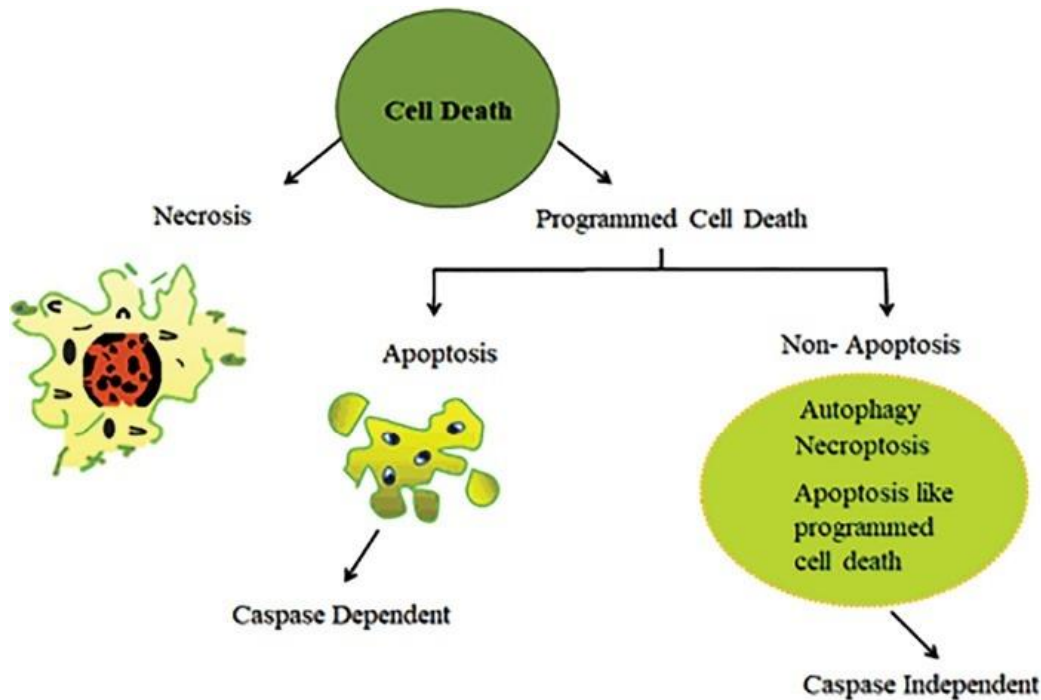
خودکشی سلولی در پیام‌های خاص است، مرگ سلولی

برنامه‌ریزی شده نامیده می‌شود. معمولاً مرگ برنامه‌ریزی شده

سلولی توسط انواع پیام‌های خارج سلولی و درون سلولی کنترل

¹ Programmed cell death

² Necrosis



شکل ۱- حالت کلی مرگ سلول‌های سرطانی مرگ سلولی سرطانی شامل دو مکانیسم کلی تعریف شده است: مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و نکروز. مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی عمدتاً مرگ سلولی پایه آپوپتوز و غیر آپوپتوز مانند اتوفازی، نکروپتوز و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده آپوپتوز است [۵].

بنابراین، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و آپوپتوز هرگز نباید مترادف در نظر گرفته شوند [۹]. کر و همکاران اصطلاح آپوپتوز را برای توصیف یک الگوی مورفولوژیکی متمایز از مرگ سلولی پیشنهاد کردند [۱۰].

آپوپتوز به طور گسترده به‌عنوان یک مکانیسم مهم مرگ تنظیم شده توصیف می‌شود که نه تنها در نتیجه آسیب سلولی یا استرس خارجی رخ می‌دهد، بلکه در طول رشد طبیعی و مورفونژن^۱ نیز رخ می‌دهد. مکانیسم اثر مرگ سلولی آپوپتوز معمولاً با تراکم مواد کروماتین، تکه تکه شدن DNA در هسته، انقباض سلولی^۲، حبایی شدن غشاء پویا و از دست دادن چسبندگی به ماتریکس‌های خارج سلولی مشخص می‌شود. علاوه بر این، تغییرات بیوشیمیایی مثل بیرونی شدن فسفاتیدیل سرین و فعال شدن سیستمین آسپارتیل پروتئازها به نام کاسپاز نیز منجر به مرگ سلولی می‌شود [۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴]. آپوپتوز به طور معمول با نکروز متمایز می‌شود، که تصور می‌شد مسیر مخالف یک انفجار سلولی نامنظم در پاسخ به ترومای شدید را نشان می‌دهد.

می‌شود که توسط محیط سلول و پیام‌های درون سلولی هدایت می‌شوند. مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از نکروز سلولی متمایز می‌شود، زیرا ویژگی‌های مورفولوژیکی متمایز دارد، هموستاز بافت را حفظ می‌کند و با حذف سلول‌های ناخواسته، تعداد مناسب سلول‌ها را در ارگان‌های چند سلولی تنظیم می‌کند. عوامل مختلف درونی خاص بافت و عوامل بیرونی آسیب زنده به سلول، سلول‌های برنامه‌ریزی شده را آغاز می‌کنند [۶، ۷].

فعال‌سازی برون‌زای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شامل عوامل فیزیکی و عوامل عفونی است که روی اکثر انواع سلول‌ها اثر می‌گذارند. عوامل فیزیکی شامل تشعشع، ضربه فیزیکی، داروهای شیمی درمانی و عوامل عفونی شامل ویروس‌ها و سموم باکتریایی است. علاوه بر این، عدم تعادل داخلی مانند خروج گلوکوکورتیکوئیدها و از دست دادن اتصال ماتریکس می‌تواند باعث آپوپتوز شود [۸].

اگرچه گروه‌های تحقیقاتی مختلف اغلب مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را با آپوپتوز یکی می‌دانند، اما مطالعات اخیر ثابت کرده‌اند که اشکال غیرآپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نیز وجود دارد که مکانیسم آپوپتوز را درگیر نمی‌کند.

¹ Morphogenesis

² Cell Shrinkage

مرگ سلولی در اثر نکروز مرتبط با التهاب مزمن، ناشی از نکروز می‌تواند تکثیر تومورها را افزایش دهد. با این حال، تصور دیگری وجود دارد که نکروز می‌تواند در طبیعت نیز برنامه‌ریزی شود. نکروز برنامه‌ریزی شده تنها در شرایط خاصی دیده شده است که در آن آپوپتوز از نظر شیمیایی یا ژنتیکی سرکوب یا مهار می‌شود [۱۹، ۲۰، ۲۱]. نشان داده شده است که پروتئین‌های مختلف آنتی‌آپوپتوز از خانواده Bcl-2 هم آپوپتوز و هم نکروز را مهار می‌کنند. کاهش ATP داخل سلولی می‌تواند پاسخ آپوپتوتیک را به نکروز تغییر دهد. بنابراین، آپوپتوز و نکروز لزوماً مسیرهای مستقلی نیستند. در عوض، آنها ممکن است برخی از پیام‌رسان‌ها، فعال‌کننده‌ها و بازدارنده‌های مشترک را به اشتراک بگذارند [۲۲].

مکانیسم‌های آپوپتوز

آپوپتوز به‌عنوان مهم‌ترین شکل مرگ سلولی شناخته می‌شود و مسیر پیام‌رسانی مولکولی آن به خوبی شناخته شده است. شناسایی مکانیسم‌های آپوپتوز بسیار مهم است و درک پاتوژنز بیماری‌ها را در نتیجه آپوپتوز ناکارآمد تسهیل می‌کند. این به نوبه خود ممکن است به تولید داروهای جدیدی که مسیرهای آپوپتوز یا ژن‌های خاص را هدف قرار می‌دهند کمک کند. در پستانداران، دو مسیر آپوپتوز مرکزی وجود دارد: مسیر بیرونی (مسیر واسطه گیرنده مرگ) و مسیر درونی (مسیر با واسطه میتوکندری) (شکل ۲). علاوه بر این دو مسیر، مسیرهای دیگری برای فعال‌سازی کاسپاز وجود دارد که کمتر شناخته شده‌اند، از جمله نقش آغازگر کاسپاز ۱۲ یا کاسپاز ۲ در آپوپتوز فعال شده توسط استرس شبکه آندوپلاسمی (ER) و همچنین مسیر پرفورین/گرانزیم^۴ مسیر دیگری است که شامل سمیت سلولی با واسطه سلول T است. این مسیر می‌تواند از طریق گرانزیم A یا گرانزیم B باعث آپوپتوز شود. همه این مسیرهای آپوپتوز (مسیرهای بیرونی، درونی و گرانزیم B) در یک مسیر پایانی یا اجرایی همگرا می‌شوند [۲۳، ۲۴].

با جمع‌آوری اطلاعات بیشتر در مورد این نوع مرگ سلولی، علاقه به اشکال غیرآپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به تدریج در حال افزایش است. انواع مرگ سلولی غیرآپوپتوز شامل اتوفاژی^۱، نکروپتوز^۲ و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شبه آپوپتوز^۳ است.

اتوفاژی یا مرگ سلولی اتوفاژیک به عنوان مرگ سلولی نوع دوم شناخته می‌شود. مرگ سلولی اتوفاژیک یک فرآیند خودتخریبی است و نقش حیاتی در تخریب اجزای سلولی داخل سلول در حال مرگ در واکنش‌های اتوفاژیک دارد. اتوفاژی به عنوان مرگ سلولی واکنشی نیز شناخته می‌شود و در بافت بی‌مهرگان بسیار رایج است [۱۵]. نکروپتوز شکل برنامه‌ریزی شده ای از مرگ نکروزه است و با همان پیام‌های مرگ آغاز می‌شود که آپوپتوز را القا می‌کند. نکروپتوز در داخل بدن، در صدمات فیزیکی، مرگ ناشی از عفونت و در اشکال مختلف تخریب عصبی بسیار شایع است [۱۶].

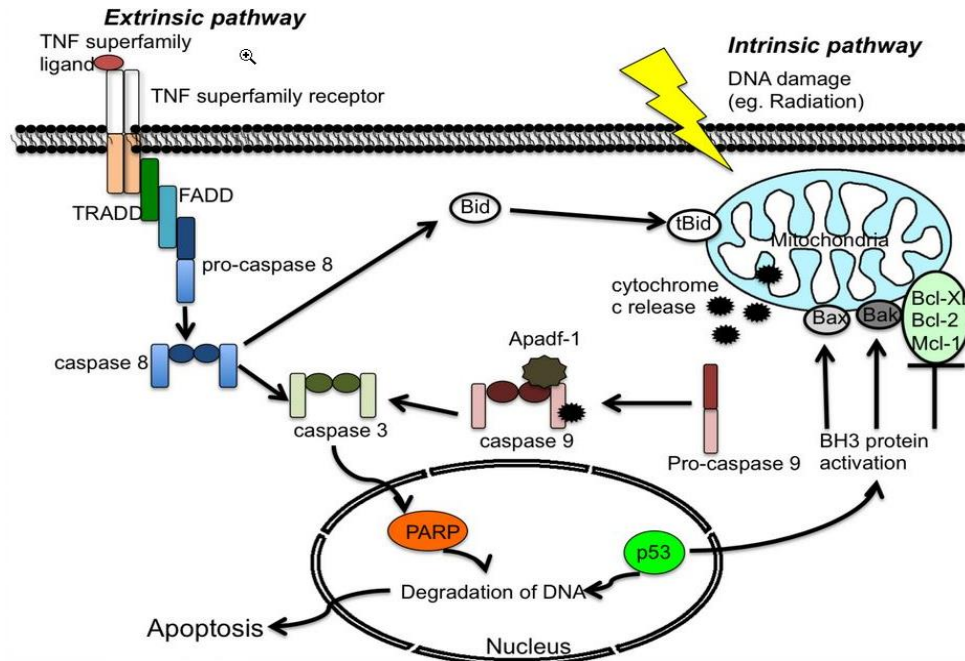
اعتقاد بر این بود که آپوپتوز و نکروپتوز (شکل تنظیم شده و برنامه‌ریزی شده مرگ سلولی) چندین فرآیند حیاتی مشترک دارند. چندین گیرنده مرگ (DRs) مانند FAS و TNFR که به القای آپوپتوز شناخته شده‌اند نیز در انواع مختلف سلول نکروپتوز را القا می‌کنند. با این حال، نکروز برنامه‌ریزی شده تنها در شرایط خاصی دیده می‌شود که آپوپتوز از نظر شیمیایی یا ژنتیکی سرکوب یا مسدود شده باشد. علاوه بر این، شکل دیگر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده شبه آپوپتوز است که نوع مرگ سلولی را که شامل ویژگی‌های آپوپتوز است، توصیف می‌کند، اما مرگ سلولی به شیوه‌ای مستقل از کاسپاز رخ می‌دهد [۱۷، ۱۸]. نکروز ممکن است در طول چندین بیماری از جمله سرطان، نورودژنراتیو و بیماری‌های خود ایمنی رخ دهد. نکروز به طور سنتی به عنوان یک فرآیند تصادفی و کنترل نشده در نظر گرفته می‌شود که معمولاً توسط محرک‌های خاصی مانند ترومای سمی یا آسیب فیزیکی آغاز می‌شود. نکروز از نظر مورفولوژیکی با تورم سیتوپلاسم و اندامک‌ها (شبکه آندوپلاسمی و میتوکندری)، اختلال در غشای پلاسمایی منجر به آزاد شدن اجزای سلولی و لیز سلولی مشخص می‌شود.

¹ Autophagy

² Necroptosis,

³ Apoptosis like programmed cell death

⁴ Perforin/Granzyme



شکل ۲- نمودار شماتیک مسیرهای درونی و بیرونی آپوپتوز [۲۶].

(TRAIL) به همین خارج سلولی گیرنده‌های غشایی آغاز می‌شود. [گیرنده‌های مرگ، یعنی گیرنده TNF نوع ۱ (TNFR1)، Fas (همچنین CD95/Apo-1 نامیده می‌شود)، گیرنده‌های TRAIL] [۲۵، ۳۱]. پس از اتصال لیگاند به گیرنده، موتیف پروتئینی مربوطه در پروتئین‌های آداپتور مانند دمین مرگ مرتبط با Fas (FADD) و دمین مرگ مرتبط با گیرنده TNF (TRADD) متصل می‌شوند.

این پروتئین‌های آداپتور همچنین دارای دمین تعامل پروتئین دیگری به نام دمین عامل مرگ (DED) هستند. پروکاسپاز-۸ همچنین حاوی DED است که با FADD DED در تعامل است [۳۲]. در این زمان، یک کمپلکس پیام رسانی القا کننده مرگ (DISC) ایجاد می‌شود که منجر به فعال‌سازی خودکار کاتالیزوری پروکاسپاز-۸ می‌شود. کاسپاز ۸ فعال کاسپازهای عامل/جلاد را فعال می‌کند که با آسیب یا تخریب هسته و سایر ساختارهای درون سلولی باعث مرگ سلولی می‌شود [۳۳].

مسیر آپوپتوز درونی میتوکندری^۲

تعدادی از محرک‌های داخلی باعث افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری می‌شوند. این عوامل استرس‌زای مختلف توسط

پروتئین‌های تنظیم کننده کلیدی در مسیرهای درونی و بیرونی، کاسپازها هستند. سه گروه از کاسپازهای پستانداران بر اساس عملکردهای خاص در مسیرهای مختلف، از جمله مسیرهای تکاملی، التهابی و آپوپتوز وجود دارند. بنابراین، برخی از کاسپازها، مانند کاسپاز ۱، نقشی در اجرای آپوپتوز ندارند، در حالی که چندین کاسپاز نقش دوگانه‌ای در پیام رسانی غیر آپوپتوز و آپوپتوز دارند. علاوه بر این، کاسپازها بر اساس موقعیت آنها در آبشارهای پیام رسانی آپوپتوز به عنوان آغازگر (کاسپاز ۸ و ۹) و کاسپازهای مؤثر یا اعدام (کاسپاز ۳، ۶ و ۷) طبقه‌بندی می‌شوند [۲۷، ۲۸، ۲۹]. کاسپازهای آغازگر، که با خودکلیواژ فعال می‌شوند، به طور متوالی کاسپازهای "جلاد" پایین دست را می‌شکافند و فعال می‌کنند. متعاقباً، کاسپازهای جلاد اجزای ضروری سلولی را برای هماهنگ کردن از بین بردن پروتئولیتیک سلول می‌شکافند [۳۰].

مسیر گیرنده مرگ بیرونی^۱

پیام رسانی آپوپتوز از طریق مسیر بیرونی با اتصال لیگاندهای خارج سلولی، به عنوان مثال، فاکتور نکروز تومور (TNF)، لیگاند Fas (Fas-L) و لیگاند القا کننده آپوپتوز مرتبط با TNF

² The mitochondrial pathway of Mitochondria

¹ Extrinsic death receptor pathway

سایر پروتئین‌های میتوکندریایی که در سیتوزول آزاد می‌شوند Smac/DIABLO و Omi/HtrA2 هستند که مکانیسم اضافی برای فعال‌سازی کاسپاز فراهم می‌کنند. Smac/DIABLO و Omi/HtrA2 با پروتئین‌های بازدارنده آپوپتوز (IAP) تعامل و مخالفت می‌کنند و فعال‌سازی کاسپاز را تقویت می‌کنند [۴۰].

مسیر ناشی از استرس شبکه آندوپلاسمی برای آپوپتوز شبکه آندوپلاسمی (ER) برای سنتز و تاخوردگی انواع مختلف پروتئین شناخته شده است. ER سالم و کارآمد برای بقای سلول‌ها و حفظ فعالیت آن بسیار ضروری است. اگر عملکرد ER مختل شود، تجمع پروتئین‌های بازنده اتفاق می‌افتد. هر زمان که ER تحت فشار قرار می‌گیرد ظرفیت تا شدن پروتئین آن قطع می‌شود.

گیرنده‌های گذرنده برای بازگرداندن عملکرد طبیعی خود، شروع استرس را تشخیص می‌دهند و سعی می‌کنند عملکرد طبیعی ER را با راه اندازی مکانیسم‌های محافظتی مختلف، که در مجموع به عنوان پاسخ پروتئین باز کردن (UPR) نامیده می‌شوند، بازگردانند [۲۴]. اگر پاسخ تطبیقی با شکست مواجه شود یا استرس طولانی شود، آپوپتوز اتفاق می‌افتد.

فرآیند پیچیده سلولی که منجر به آپوپتوز می‌شود از طریق سه گیرنده گذرنده از غشای ER، یعنی ER کیناز پانکراس (PKR)، فعال کننده فاکتور رونویسی ۶ (ATF-6) و اینوزیتول آنزیم-۱ (IRE-1) انجام می‌شود [۲۴، ۴۲]. هنگامی که سلول‌ها در حالت استراحت هستند، هر سه گیرنده استرس ER از طریق ارتباط آنها با پروتئین ۷۸ تنظیم شده با گلکز (GRP78) و همراه ER در حالت غیرفعال باقی می‌مانند. به دلیل استرس طولانی مدت هنگام تجمع پروتئین بازنده، تجزیه GRP78 رخ می‌دهد که UPR^۱ را فعال می‌کند، یک پاسخ پیش‌بقا برای بازگرداندن عملکرد طبیعی ER با کاهش تجمع پروتئین‌های بازنده [۴۳، ۴۴].

پس از فعال‌سازی UPR، اگر استرس بازایی نشود یا تجمع پروتئین ادامه یابد، پیام رسانی پیش بقا^۲ به پیام رسانی پروآپوپتوز

چندین پروتئین درون سلولی که پیام را به میتوکندری می‌فرستند شناسایی می‌شوند و این به نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری ختم می‌شود. این نفوذ پذیری از طریق انواع برهمکنش‌های غشای پروتئین و پروتئین - پروتئین خانواده پروتئین لنفوم ۲ سلول B (BCL-2) انجام می‌شود. خانواده پروتئین‌های Bcl-2 شامل ۲۵ عضو ایجاد کننده آپوپتوز و ضدآپوپتوز می‌باشد. سلامت سلولی به تعادل بین این پروتئین‌های Bcl-2 ایجاد کننده آپوپتوز و ضدآپوپتوز متکی است. اعضای خانواده Bcl-2 حاوی یک یا چند دمین همسانی (BH) Bcl-2 هستند، آنهایی که دارای چهار دمین همسانی BCL-2 می‌باشند شامل BCL-2، MCL-1، A1/Bfl-1، Bcl-B/Bcl2L10، و BCL-xL هستند.

اعضای خانواده ایجاد کننده آپوپتوز به دو زیر گروه دیگر طبقه‌بندی می‌شوند، بر اساس این که آیا آنها دارای چندین دمین BH (پروتئین‌های موثر) هستند، از جمله: BAX، BAK، و BOK، یا اینکه فقط حاوی دمین BH3 هستند، شامل BID، BIM، PUMA، NOXA، BIK، BAD، HRK، و BMF [۳۴، ۳۵].

به دنبال محرک‌های آپوپتوز، پروتئین‌های دارای BH3 فعال می‌شوند و به غشای خارجی میتوکندری وارد می‌شوند تا باعث آزاد شدن سیتوکروم C و سایر پروتئین‌های میتوکندریایی، از جمله فاکتور الفاکتور آپوپتوز (AIF) و اندونوکلاز G، Smac/DIABLO شوند. متعاقباً، در سیتوزول، سیتوکروم C با فاکتور فعال کننده پروتئین آپوپتوز ۱ (Apaf1) برهمکنش می‌کند و مجموعه‌ای را تشکیل می‌دهد که به عنوان آپوپتوزوم شناخته می‌شود [۳۶].

آپوپتوزوم، یک پلتفرم چند پروتئینی متشکل از یک مجتمع حلقه‌ای شکل، منجر به فعال شدن کاسپاز آغازگر (معمولاً کاسپاز ۹) می‌شود که به نوبه خود کاسپاز ۳ را فعال می‌کند و یک کاسپاز را آغاز می‌کند و این آشبار، در نهایت منجر به تخریب سلول می‌شود. AIF و اندونوکلاز G هر دو می‌توانند مرگ سلولی مستقل از کاسپاز را از طریق القای تراکم کروماتین و برش DNA هسته‌ای افزایش دهند. علاوه بر نقش اساسی AIF در اجرای مرگ سلولی مستقل از کاسپاز، AIF به عنوان یک پروتئین مهم برای بقای سلول ظاهر شده است [۲۵، ۳۷، ۳۸، ۳۹].

¹ Unfold Protein Response

² Prosurvival

برای فعال کردن پروکاسپازها ضروری هستند [۵۲]. از مطالعات روی IAP‌های پستانداران، مشخص است که IAP‌ها در هر دو مسیر اصلی آپوپتوز، گیرنده‌های مرگ ساختار سلولی و همچنین مسیر وابسته به سیتوکروم C (Apafs) عمل می‌کنند. در مسیر گیرنده‌های مرگ سطح سلولی، IAP‌ها کاسپاز ۳ و کاسپاز ۷ را مسدود می‌کنند، در نتیجه توقف آپوپتوز کاسپاز ۸ آغاز می‌شود. در مسیر وابسته به سیتوکروم C که مسیر Apafs نیز نامیده می‌شود، IAP‌ها در سه مرحله مجزا شامل برهمکنش مستقیم با پروکاسپاز-۹ در نتیجه تداخل در پردازش آن، رقابت برای اتصال Apaf-1 و مهار مستقیم کاسپازهای فعال کار می‌کنند.

سرطان و آپوپتوز

سرطان یکی از تهدیدات عمده سلامت عمومی در جهان کنونی است. انواع عمده‌ای که باعث مرگ در سراسر جهان می‌شوند عبارتند از: سرطان ریه، سرطان معده، سرطان کولورکتال، سرطان کبد و سرطان سینه. در اصطلاح عددی کارسینوم سلول سنگفرشی ممکن است به عنوان یک مشکل کوچک در نظر گرفته شود اما باعث مرگ و میر زیادی در سراسر جهان می‌شود [۵۳]. در این بیماری یک سلول طبیعی به دلیل تغییرات ژنتیکی متوالی به یک سلول بدخیم تبدیل می‌شود. از سوی دیگر، آپوپتوز به عنوان سلول‌های بدخیم بالقوه را از بین می‌برد، از این رو کاهش آپوپتوز می‌تواند نقش کلیدی در سرطان‌زایی داشته باشد. معمولاً سه مکانیسم وجود دارد که توسط آنها آپوپتوز مقاومت یا کاهش پیدا می‌کند. اینها اختلال در تعادل پروتئین‌های پروآپوپتوز و آنتی‌آپوپتوز، کاهش عملکرد کاسپازها و اختلال در پیام‌رسانی گیرنده‌های مرگ است. پروتئین‌های خانواده Bcl-2 نقش حیاتی را در تنظیم آپوپتوز از طریق مسیر ذاتی ایفا می‌کنند. آنها از هر دو پروتئین پروآپوپتوز و ضدآپوپتوز تشکیل شده‌اند. بر اساس عملکرد و همسانی Bcl-2، اعضای خانواده دارای دمین bcl-2 را می‌توان به سه گروه تقسیم کرد.

گروه اول از پروتئین‌های آنتی‌آپوتوتیک تشکیل شده است. از طرف دیگر گروه دوم و سوم پروتئین‌های پروآپوتوتیک هستند. اختلال در تعادل پروتئین پروآپوپتوز و آنتی‌آپوپتوز باعث آپوپتوز نامنظم می‌شود. p53 مستقیماً با اعضای خانواده Bcl-2 تعامل دارد و بر آپوپتوز تأثیر می‌گذارد [۵۴]. نشانگرهای آپوپتوز هدف

تغییر می‌کند. پیام‌هایی با واسطه UPR ممکن است با سه مرحله متمایز یعنی شروع، تعهد و اجرا باعث آپوپتوز شوند.

هنگامی که سلول‌ها در حالت استراحت هستند، پروآپوپتوز Bax و Bak (Bax/Bak) با برهمکنش با BCL2 بر روی غشاهای میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی (ER) غیر فعال می‌مانند، در حالی که Bim (BH3) با اتصال به داینین اسکلت سلولی^۱ مهار می‌شود. در مرحله شروع، استرس شدید ER منجر به فعال شدن کیناز N ترمینال c-Jun (JNK) و القای پروتئین همولوگ C/EBP (CHOP) می‌شود [۴۵، ۴۶].

هم JNK و هم CHOP اثر ضدآپوپتوز BCL2 را از بین می‌برند و CHOP بیان BCL2 را مسدود می‌کند، در حالی که JNK آن را فسفریله می‌کند. JNK همچنین Bim را فسفریله می‌کند. از آنجایی که JNK، Bim را فسفریله می‌کند، از اسکلت سلولی آزاد می‌شود و فعال می‌شود که این در مرحله تعهد اتفاق می‌افتد. همه این تغییرات با هم باعث فعال شدن Bax و Bak، انتقال پیام از ER به میتوکندری و همچنین مرگ می‌شود. پیشنهاد شده است که کاسپاز ۱۲ یک واسطه کلیدی آپوپتوز ناشی از استرس ER است [۲۴، ۴۷، ۴۸]. با توجه به این تغییرات این مرحله را مرحله اجرا می‌نامند.

سرکوبگرهای آپوپتوز

سرکوبگرهای آپوپتوز، پروتئین‌های خانواده بازدارنده آپوپتوز (IAP) هستند. پروتئین خانواده IAP برای اولین بار در باکولوویروس‌ها کشف شد و با دمین جدیدی از ۷۰ اسید آمینه به نام تکرار IAP baculoviral (BIR) مشخص می‌شود [۴۹، ۵۰]. تا به امروز دو IAP در باکولوویروس‌ها (cp-IAP و op-IAP)، دو مورد در مگس سرکه (DIAP-1 و DIAP-2) و ۶ مورد در انسان (NAIP، c-IAP1/HiAP-2، c-IAP2، HIAP-1، XIAP/hILP، Survivin) کشف شده است. هدف دقیق مهار توسط IAP‌ها در حال حاضر ناشناخته است و دو مدل برای آنها فرض می‌شود. مدل اول پیشنهاد می‌کند که IAP‌ها با تداخل مستقیم با فعالیت کاتالیزوری کاسپازهای خاص، آپوپتوز را مهار می‌کنند [۵۱] و طبق مدل دوم IAP‌ها ممکن است پروکاسپازها را مهار کنند یا سایر پروتئین‌هایی که

¹ Cytoskeletal dynein

برای سرطان سینه، تخمدان و کولورکتال مفید هستند. علاوه بر این، قطعات DNA در گردش پتانسیل نظارت بر درمان در تومورهای جامد مختلف را نشان داده‌اند [۵۵]. افزایش چندین نشانگر آپوپتوز در بیماران سرطانی نیز قبل یا در زمان عود تومور توصیف شده است. اینها شامل 1-CYFRA21، TPS، TPA و قطعات DNA در حال گردش در سرطان‌های مختلف است.

تشخیص و مطالعه آپوپتوز

تکنیک‌های مختلفی برای تشخیص و مطالعه آپوپتوز وجود دارد. میکروسکوپ نوری و الکترونی برای این فرآیند بسیار مفید هستند. به دلیل عدم همگام‌سازی سلولی در آپوپتوز و از آنجایی که سلول‌های آپوپتوز به سرعت از طریق فاگوسیتوز از بین می‌روند، روش مطالعه بر اساس معیارهای مورفولوژیکی برای نشان دادن آن کافی است اما برای کمی‌سازی آن مفید نیست.

تغییر در غشای پلاسمایی

در زمان آپوپتوز، لیپید فسفاتیدیل سرین، از لایه داخلی به بیرونی غشای پلاسمایی منتقل می‌شود. پروتئین Annexin V یک پروتئین وابسته به کلسیم است که ترجیحاً به فسفاتیدیل سرین با میل ترکیبی بالا متصل می‌شود و اگر به یک برچسب فلورسنت کوئزوگه شود، Annexin V می‌تواند برای تشخیص این تغییر اولیه سطح سلولی آپوپتوز استفاده شود [۵۷].

تغییر در میتوکندری

اختلال عملکرد میتوکندری در طول آپوپتوز رخ می‌دهد و با کاهش پتانسیل غشایی همراه است. سنجش پتانسیل غشایی توانایی میتوکندری را برای تغلیظ یک رنگ کاتیونی با استفاده از گرادیان پروتون آن آزمایش می‌کند. تشخیص سیتوکروم c آزاد شده برای تمام مراحل آپوپتوز اختصاصی است [۵۷].

تغییرات سیتوپلاسمی

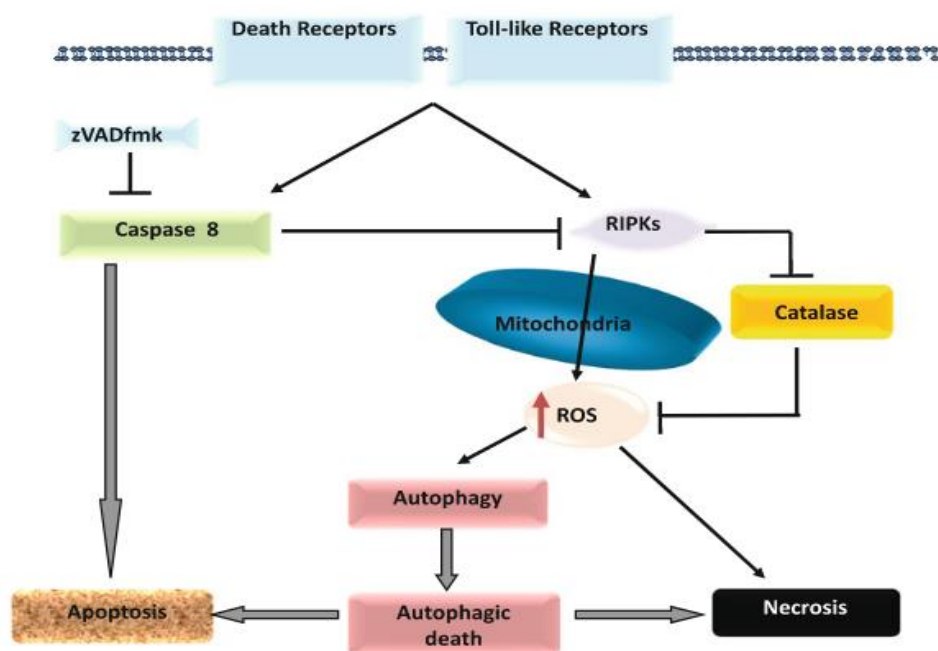
فعال شدن کاسپازها تغییر مشخصه در سیتوپلاسم در طول آپوپتوز است. سنجش کاسپاز ممکن است مراحل اولیه تا اواخر آپوپتوز را تشخیص دهد [۵۷].

اصولی استراتژی‌های درمانی تومورهای بدخیم، بازگرداندن تعادل بین انحطاط و تکثیر سلول‌ها است.

هر زمان که آپوپتوز فیزیولوژیکی اتفاق بیفتد، اکثر محصولات مرگ سلولی به‌طور موثر توسط ماکروفاژها و سلول‌های مجاور حذف می‌شوند، در حالی که در شرایط پاتولوژیک این سیستم دچار اختلال یا بارگذاری بیش از حد می‌شود و مقدار قابل توجهی از محصولات مرگ سلولی می‌تواند در گردش خون جمع شود.

رایج‌ترین نشانگرهای مورد بررسی در بیماران سرطانی شکل محلول گیرنده آپوپتوز، sFas و لیگاند آن FasL، سیتوکراتین مختلف و قطعات DNA در گردش بوده است. از آنجایی که نشانگرهایی که در خون در گردش هستند بسیار آسان در دسترس هستند، آنها برای اندازه‌گیری بسیار مفید هستند، اما تعیین کمیت در خون ممکن است کمی دشوار باشد. این محصولات در تشخیص، پیش‌آگهی و نظارت بر بیماری بسیار مفید هستند. مطالعات نشان می‌دهند که در مقایسه با افراد سالم، فرم محلول آنتی‌آپوپتوز گیرنده fas (sFas) و لیگاند پروآپوپتوز fas-L (Fas-L) در بیماران مبتلا به انواع سرطان افزایش می‌یابد. در برخی از این تومورها sFas و sFasL نیز با مرحله تومور مرتبط است. نشانگرهای دیگر عبارتند از 1-CYFRA21 (قطعات سیتوکراتین ۱۹)، آنتی ژن پلی‌پپتیدی بافتی (TPA)، قطعات سیتوکراتین ۸، ۱۸ و ۱۹ و همه اینها در انواع اختلالات خوش خیم و بدخیم افزایش می‌یابند [۵۵، ۵۶].

پس از اینکه تشخیص سرطان مشخص شد، اندازه‌گیری غلظت نشانگرهای آپوپتوتیک اغلب قبل از درمان انجام می‌شود. همراه با نشانگرهای بالینی از آنها برای تخمین بقای کلی و بقای بدون پیشرفت استفاده می‌شود. نشانگرهای آپوپتوز اختصاصی اندام، پتانسیل قابل توجهی برای تخمین پیش‌آگهی سرطان دارند. در تجزیه و تحلیل تک متغیره، سطوح بالای sFas نشان داده شده است که با بقای کلی ضعیف در بسیاری از تومورها مرتبط است. اندازه‌گیری این پارامتر برای پیش‌آگهی درمان نیز مفید است. کاهش سریع سطوح نشانگر نشان‌دهنده اثربخشی درمانی است، اما از سوی دیگر افزایش یا کاهش آهسته با پاسخ ناکافی به درمان همراه است. 1-CYFRA21 برای نظارت بر سرطان ریه، دهانه رحم و سر و گردن بسیار مفید است. در حالی که TPA و TPS



شکل ۳- تعدیل حالت مرگ سلولی توسط فعالیت کاسپاز و پیامدهای مهار کاسپاز [۵۸]

عمده میاستنی گراویس و لوپوس اریتماتوز سیستمیک^۲، بیماری‌های التهابی مانند آسم، بیماری التهابی روده و عفونت‌های ویروسی ناشی از آدنوویروس، باکولوویروس هستند. در اختلالات نئوپلاستیک، نقص‌هایی در ژن‌هایی مانند p53، ras یا c-myc وجود دارد که با جهش، غیرفعال شدن یا اختلال در تنظیم، منجر به تجمع سلولی، مقاومت در برابر درمان و نظارت ناقص تومور توسط سیستم ایمنی می‌شود.

ژن سرکوبگر تومور^۳ نقش اصلی را در دفاع در برابر تبدیل بدخیم ایفا می‌کند. مشخص شده است که این ژن در ۵۰ درصد سرطان‌های انسانی غیرفعال می‌شود. همچنین بیان ژن bcl-2 در سلول‌های تومور تغییر می‌کند که از طریق مهار مستقیم آپوپتوز به بقای سلول‌های سرطانی کمک می‌کند [۶۰]. در بیماری خودایمنی یک جهش ژنی وجود دارد که برای آپوپتوز در برابر لنفوسیت‌های خود واکنشی^۴ مقاومت می‌کند در حالی که در یک پاسخ ایمنی طبیعی مرگ آپوپتوز، لنفوسیت‌های خود واکنشی وجود دارد. در اختلالات ویروسی نیز همین اتفاق می‌افتد. برخی از ویروس‌ها قادر به مهار آپوپتوز سلول‌های آلوده هستند. بیماری‌هایی که به دلیل آپوپتوز بیش از حد ایجاد می‌شوند

تغییر DNA

تراکم کروماتین و تکه تکه شدن DNA یکی از نشانه‌های آپوپتوز است. در مرحله آخر آپوپتوز، اندونوکلیازهای فعال شده با کاسپاز، DNA دورشته‌ای را می‌شکنند. این قطعات نوکلئوزومی آپوپتوز را می‌توان با الکتروفورز ژل به عنوان نردبان DNA معمولی حل کرد. سنسجش TUNEL (برچسب‌گذاری انتهایی دئوکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز ترمینال dUTP [TdT]) از TdT برای علامت‌گذاری نقاط شکست با نوکلئوتیدهای برچسب‌دار (مثلاً بیوتینیله^۱) استفاده می‌کند، که سپس با استفاده از برچسب آنزیمی (برای IHC) یا برچسب‌گذاری شده با فلورسنت (برچسب‌های فلورسنت FACS) شناسایی می‌شوند [۵۹].

نقش آپوپتوز در بیماری‌های مختلف

بیماری‌های ناشی از آپوپتوز را می‌توان به دو گروه تقسیم کرد، بیماری‌های ناشی از مهار آپوپتوز که منجر به افزایش بقای سلولی می‌شود یا ناشی از آپوپتوز بیش‌فعال که منجر به افزایش مرگ سلولی می‌شود. بیماری‌هایی که به دلیل مهار آپوپتوز ایجاد می‌شوند، نئوپلاسم‌های مختلف، بیماری‌های خود ایمنی به طور

² Myasthenia gravis and Systemic lupus erythematosus

³ The tumor suppressor gene

⁴ Auto Reactive Lymphocytes

¹ Biotinylated

استراتژی‌های درمانی است. این مقاله در همین راستا سعی نموده است تا با تقویت بینش آپوپتوز، رویکردهای درمانی مؤثر و ویژه‌ای مانند فعال‌سازی هدفمند سرکوب‌کننده‌های تومور پروآپوپتوز یا محاصره انکوژن‌های ضدآپوپتوز در سرطان و درمان مرگ زودرس سلولی در تخریب عصبی را بهتر توضیح دهد. با این حال مکانیزم عمل یا استراتژی‌های درمانی بسیاری از داروهای جدید که برای تقویت آپوپتوز طراحی شده، نیازمند بررسی‌های کاملی از فرایند آپوپتوز می‌باشند. در بدن انسان یک هموستاز بین سلول‌های تولید شده توسط میتوز و مرگ سلولی توسط آپوپتوز حفظ می‌شود و درک مکانیسم‌های پیام‌رسانی آپوپتوز بسیار مهم است، زیرا اختلال در تنظیم آن به طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها کمک می‌کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمامی دوستان و همکارانی که ما را از راهنمایی‌های خود بهره‌مند نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

- [1] Galluzzi L, Vitale I, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, Blagosklonny M, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*. 2012; 19(1): 107-20.
- [2] Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation*. 2007; 14(7): 1237.
- [3] Trump BE, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic pathology*. 1997; 25(1): 82-8.
- [4] Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*. 2011; 147(4): 742-58.
- [5] Jan R. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2019; 9(2): 205.
- [6] Xu X, Wang J, Xia Y, Yin Y, Zhu T, Chen F, et al. Autophagy, a double-edged sword for oral tissue regeneration. *Journal of Advanced Research*. 2024; 59: 141-59.
- [7] Li C, Yin X, Xue P, Wang F, Song R, Song Q, et al. Apoptosis and autophagy of muscle cell

عبارتند از ایدز، اختلالات نورودژنراتیو مختلف، بیماری‌های خونی و بیماری‌های ناشی از آسیب بافتی مانند انفارکتوس میوکارد، ضایعه عروقی مغزی، آسیب کلیوی ایسکمیک و کلیه پلی‌کیستیک [۶۱]. ایدز به دلیل ابتلا به ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) است. در ایدز تعادل بین تعداد لنفوسیت‌های CD4 مثبت و توانایی مغز استخوان برای تولید سلول‌های بالغ جدید از دست می‌رود. این ویروس با اتصال به گیرنده CD4+، سلول‌های T را آلوده می‌کند. این ویروس متعاقباً وارد سلول T می‌شود، جایی که تصور می‌شود پروتئین HIV Tat بیان‌گیرنده Fas را افزایش می‌دهد و منجر به آپوپتوز بیش از حد سلول‌های T می‌شود [۶۲].

در اختلالات نورودژنراتیو به نظر می‌رسد مرگ نوروها با افزایش حساسیت به آپوپتوز در این سلول‌ها همراه باشد. خون‌سازی توسط برخی عوامل تغذیه‌ای مانند اریثروپویتین، عوامل محرک کلنی، سیتوکین‌ها و غیره تنظیم می‌شود. در اختلالات خونی، وجود سطوح غیرطبیعی فاکتور تروفیک^۱ طبیعی باعث تجمع سلول‌های نابالغ می‌شود. در سلول‌های ایسکمیک افزایش ناگهانی رادیکال‌های اکسیژن فعال باعث القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که افزایش سن با افزایش شکنندگی سلولی همراه است که باعث می‌شود لنفوسیت‌ها در هنگام فعال شدن دچار آپوپتوز شوند. آپوپتوز همچنین ممکن است با آلرژی‌هایی مانند آسم، رینیت آلرژیک و درماتیت آلرژیک همراه باشد. به نظر می‌رسد اوزینوفیل‌ها به طور فعال در رفع التهابی که مشخصه آسم است، همکاری می‌کنند.

نتیجه‌گیری

مکانیسم‌های منجر به آپوپتوز بسیار پیچیده هستند و مسیرهای زیادی را در بر می‌گیرند. در هر نقطه از این مسیرها ممکن است نارسایی‌هایی رخ دهد و منجر به تبدیل سلول‌های آسیب دیده به سلول‌های سرطانی گردد که متاستاز تومور و مقاومت در برابر داروهای ضد سرطان را در پی دارد. بنابراین، علی‌رغم اینکه آپوپتوز علت مشکل است، بررسی این فرایند نقش مهمی در درمان سرطان نیز ایفا می‌کند و هدف محبوب بسیاری از

¹ Trophic

- during pork postmortem aging. *Animal Bioscience*. 2024; 37(2): 284.
- [8] Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. *Molecular and cellular biology*. 1998; 18(1): 608-15.
- [9] Biswas U, Roy R, Ghosh S, Chakrabarti G. The interplay between autophagy and apoptosis: its implication in lung cancer and therapeutics. *Cancer Letters*. 2024: 216662.
- [10] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972; 26(4): 239-57.
- [11] Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2013; 1833(12): 3448-59.
- [12] Proskuryakov SY, Gabai V, Konoplyannikov A. Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry (Moscow)*. 2002; 67: 387-408.
- [13] Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*. 2014; 19: 555-66.
- [14] Hudaya T, Gul-e-Saba TM, Ismail N, Mohammad T. Methanol extracts of four selected marine sponges induce apoptosis in human breast cancer cell line, MCF-7. *Int J Res Pharm Sci*. 2017; 8(4): 667-75.
- [15] Sharma P, Kaushal N, Saleth LR, Ghavami S, Dhingra S, Kaur P. Oxidative stress-induced apoptosis and autophagy: Balancing the contrary forces in spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2023; 1869(6): 166742.
- [16] Ma Q, Yu J, Zhang X, Wu X, Deng G. Wnt/ β -catenin signaling pathway-a versatile player in apoptosis and autophagy. *Biochimie*. 2023; 211: 57-67.
- [17] Najafov A, Chen H, Yuan J. Necroptosis and cancer. *Trends in cancer*. 2017;3(4):294-301.
- [18] Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*. 2008;135(7):1161-3.
- [19] Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS letters*. 2005; 579(15): 3287-96.
- [20] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*. 2012; 45(6): 487-98.
- [21] Lotze MT, Demarco RA. Dying dangerously: necrotic cell death and chronic inflammation. *Discovery medicine*. 2009; 4(24): 448-56.
- [22] Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological sciences*. 2011; 119(1): 3-19.
- [23] Hassen S, Ali N, Chowdhury P. Molecular signaling mechanisms of apoptosis in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 2012; 3(3): 71.
- [24] Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*. 2006; 7(9): 880-5.
- [25] Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology & therapy*. 2005; 4(2): 147-71.
- [26] Yuan C-H, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Modulation of Apoptotic Pathways by Human Papillomaviruses (HPV): Mechanisms and Implications for Therapy. *Viruses*. 2012; 4(12): 3831-50.
- [27] Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008; 27(48): 6194-206.
- [28] Weyhenmeyer B, Murphy A, Prehn J, Murphy B. Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Experimental oncology*. 2012.
- [29] Hu Q, Wu D, Chen W, Yan Z, Shi Y. Proteolytic processing of the caspase-9 zymogen is required for apoptosome-mediated activation of caspase-9. *Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288(21): 15142-7.
- [30] Sahoo G, Samal D, Khandayataray P, Murthy MK. A review on caspases: key regulators of biological activities and apoptosis. *Molecular neurobiology*. 2023; 60(10): 5805-37.
- [31] Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*. 2009; 23(6): 1625.
- [32] Khosravi-Far R. Death receptor signals to the mitochondria. *Cancer biology & therapy*. 2004;3(11):1051-7.
- [33] Guedes JP, Boyer JB, Elurbide J, Carte B, Redeker V, Sago L, et al. NatB Protects Procaspase-8 from UBR4-Mediated Degradation and Is Required for Full Induction of the Extrinsic Apoptosis Pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 2024: 1-14.
- [34] Chipuk J, Bouchier-Hayes L, Green D. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death & Differentiation*. 2006; 13(8): 1396-402.
- [35] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and

- therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014; 15(1): 49-63.
- [36] Ding Y, Chen L, Xu J, Feng Y, Liu Q. APAF1 Silencing Ameliorates Diabetic Retinopathy by Suppressing Inflammation, Oxidative Stress, and Caspase-3/GSDME-Dependent Pyroptosis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2024; 1635-49.
- [37] Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*. 2013; 21(4): 501-15.
- [38] Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412(6842):95-9.
- [39] Sevrioukova IF. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxidants & redox signaling*. 2011; 14(12): 2545-79.
- [40] Gustafsson ÅB, Gottlieb RA. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovascular research*. 2008;77(2): 334-43.
- [41] Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death & Differentiation*. 2008; 15(3): 453-60.
- [42] Zhang Q, Liu G, Liu R, Liu J, Zeng X, Ren D, et al. Dual role of endoplasmic reticulum stress-ATF-6 activation in autophagy and apoptosis induced by cyclic stretch in myoblast. *Apoptosis*. 2023; 28(5): 796-809.
- [43] Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*. 2005; 74: 739-89.
- [44] Beilankouhi EAV, Sajadi MA, Alipourfard I, Hassani P, Valilo M, Safaralizadeh R. Role of the ER-induced UPR pathway, apoptosis, and autophagy in colorectal cancer. *Pathology-Research and Practice*. 2023;154706.
- [45] Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development*. 1998; 12(7): 982-95.
- [46] Teng L, Qin Q, Zhou Z-y, Zhou F, Cao C-y, He C, et al. Role of C/EBP Homologous Protein in Vascular Stenosis After Carotid Artery Injury. *Biochemical Genetics*. 2024: 1-18.
- [47] Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Annals of the new York Academy of Sciences*. 2003; 1010(1): 186-94.
- [48] Schweighofer SV, Jans DC, Keller-Findeisen J, Folmeg A, Ilgen P, Bates M, et al. Endogenous BAX and BAK form mosaic rings of variable size and composition on apoptotic mitochondria. *Cell Death & Differentiation*. 2024; 31(4): 469-78.
- [49] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes & development*. 1999; 13(3): 239-52.
- [50] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual review of cell and developmental biology*. 1999; 15(1): 269-90.
- [51] Gao T, Magnano S, Rynne A, O'Kane L, Barroeta PH, Zisterer DM. Targeting inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) enhances susceptibility of oral squamous carcinoma cells to cisplatin. *Experimental Cell Research*. 2024; 437(1): 113995.
- [52] Seshagiri S, Miller LK. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sfcaspase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997; 94(25): 13606-11.
- [53] Masthan K, Babu NA, Dash KC, Elumalai M. Advanced diagnostic aids in oral cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012; 13(8): 3573-6.
- [54] Bell HL, Blair HJ, Jepson Gosling SJ, Galler M, Astley D, Moorman AV, et al. Combination p53 activation and BCL-xL/BCL-2 inhibition as a therapeutic strategy in high-risk and relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2024: 1-13.
- [55] Holdenrieder S, Stieber P. The potential of apoptotic markers in diagnostic oncology. *Clinical Laboratory International: Analyte of the month*. 2004.
- [56] Peng C, Wang Y, Guo Y, Li J, Liu F, Fu Y, et al. A literature review on signaling pathways of cervical cancer cell death-apoptosis induced by Traditional Chinese Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2024;118491.
- [57] Sankari SL, Masthan K, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer-an update. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2012; 13(10): 4873-8.
- [58] Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, et al. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2013; 61(1): 43-58.
- [59] Garg G, Patel P, Gupta GD, Kurmi BD. A Review on Working Principle and Advanced Applications of Fluorescence activated Cell Sorting Machine (FACS). *Current Pharmaceutical Analysis*. 2024; 20(2): 85-97.
- [60] Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*. 2011; 30(1): 1-14.

[61] Ramirez C, Carracedo A, Moreno A, Guerra M. Apoptosis and disease, *Alergol. Immunol Clin.* 1999; 3: 367-74.

[62] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology.* 2007; 35(4): 495-516.

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ترمیمی رزمارینیک اسید بر نقیصه تجربی نخاع در مدل حیوانی موش صحرایی نژاد ویستار

سید احمد عمادی^۱، هادی نداف^۲، الهام حویزی^{۳*}

^۱ دانشجوی دوره دستیاری تخصصی جراحی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ استاد بخش جراحی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^{۳*} دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: e.hoveizi@scu.ac.ir

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و اهداف: آسیب طناب نخاعی وضعیتی است که در آن پارانشیم نخاع در اثر ضربه یا بیماری‌های مختلف آسیب می‌بیند. بخشی از آسیب‌های نخاعی عمدتاً توسط واکنش‌های التهابی ایجاد می‌شوند که عملکرد سلول را تغییر می‌دهد و باعث مرگ سلول‌های عصبی باقی مانده می‌شود. رزمارینیک اسید، یک پلی فنول فیتوشیمیایی محلول در آب، دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آپوپتوز است.

روش بررسی: در این پژوهش ۱۲ موش صحرایی از نژاد ویستار در دو گروه با جمعیت مساوی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. گروه کنترل هیچ درمانی پس از آسیب نخاعی تا روز ۵۶ مطالعه دریافت نکردند و گروه رزمارینیک اسید روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره رزمارینیک اسید در آب آشامیدنی تا روز ۵۶ پس از آسیب نخاعی دریافت کردند. در طول این دوره موش‌ها از نظر حرکتی با آزمون باسو - بتی - برسناهان (Basso, Beattie and Bresnahan) مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند.

یافته‌ها: بر اساس ارزیابی بازیابی حرکتی موش‌ها، گروه تحت درمان با رزمارینیک اسید نسبت به گروه کنترل نمره بالاتری را کسب کردند. همچنین نتایج حاصل از بررسی مقاطع بافتی نشان دهنده بهبودی و ترمیم بهتر، کاهش حجم عارضه و افزایش میلینه شدن رشته‌های عصبی در محل آسیب نخاعی در گروه تحت درمان با رزمارینیک اسید به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0/005$).

بحث: نتایج حاصل از این پژوهش نشان دهنده اثرات ترمیمی رزمارینیک اسید در آسیب‌های نخاعی در موش‌های صحرایی می‌باشد که ممکن است بعنوان یک عامل درمانی برای درمان صدمات نخاعی مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: ضایعه نخاعی، رزمارینیک اسید، محافظت عصبی، التهاب، مدل حیوانی.

مقدمه

به فلج شدن سیستم‌های عصبی حسی، حرکتی و خودکار در پایین‌تر از محل آسیب می‌شود. تقریباً ۲۵۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ نفر هر ساله در سراسر جهان دچار آسیب نخاعی می‌شوند و تخمین

آسیب طناب نخاعی (SCI) وضعیتی است که در آن پارانشیم نخاع در اثر ضربه یا بیماری‌های مختلف آسیب می‌بیند و منجر

ایمپلنت‌های عصبی و سلول‌های بنیادی باعث پیشرفت در کاهش التهاب عصبی، رشد آکسونی، افزایش میلین و کاهش اندازه نقیصه می‌شود [۱۱]. فیزیولوژی طبیعی طناب نخاعی شامل تعامل بین بسیاری از انواع سلول مانند آستروسیت‌ها، نورون‌ها، میکروگلیا و الیگودندروسیت‌ها می‌باشد. پس از آسیب ستون فقرات، این فعل و انفعالات چند سلولی قطع شده و به هم ریخته و منجر به اختلال در بهبود ستون فقرات می‌شود [۱۲].

درمان‌های موجود محدود است و تنها به بیماران دارای ناتوانی مادام‌العمر، کمک حمایتی می‌کنند [۱۳]. عوامل مختلفی مانند ویژگی‌های پیچیده، ناسازگاری‌های فراوان و پیامدهای پاتوفیزیولوژیک پیچیده پس از آسیب نخاعی دلایل اصلی درک ضعیف و شکست درمان آسیب نخاعی هستند [۱۴]. بنابراین، مداخله درمانی زودهنگام یک استراتژی مهم برای بازیابی عملکردی در درمان آسیب نخاعی است و تحقیقات پایه و بالینی به طور فعال بر روی مراحل حاد و تحت حاد آسیب نخاعی در حال انجام است [۱۵].

آسیب اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز نقش مهمی در گسترش آسیب ثانویه پس از آسیب نخاعی دارند [۱۶]. بر این اساس، از فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی به صورت درمانی در بیماران آسیب نخاعی استفاده می‌شود. علیرغم میزان بالای مرگ و میر حاصل از این آسیب و فقدان درمان موثر برای آسیب نخاعی وجود دارد. اما محصولات طبیعی منبع مهمی از داروهای جدید برای درمان آسیب‌های عصبی هستند [۱۷]. گیاهان دارویی برای مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) تولید شده در طول فتوسنتز، آنتی‌اکسیدان‌هایی تکامل یافته دارند [۱۸]. آنتی‌اکسیدان‌های حاصل از منابع گیاهی نقش مهمی در حفظ سلامت انسان دارند. در واقع، اجزای گیاهی فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در مدل آسیب نخاعی نشان داده‌اند. بنابراین، آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی پتانسیل درمانی برای آسیب نخاعی محسوب می‌شوند [۱۷].

برای اولین بار، در سال ۱۹۵۸، اسکارپتی و اورینته، دو شیمیدان ایتالیایی، رزمارینیک اسید (RA) را به عنوان یک عامل اصلی جدا کردند و مطابق با گیاهی که از آن مشتق شده بود، *Rosmarinus officinalis* نامگذاری نمودند [۱۹، ۲۰]. اسید رزمارینیک به عنوان یک ترکیب پلی فنول طبیعی محلول در آب

زده می‌شود که ۲ تا ۳ میلیون نفر با ناتوانی‌های مربوط به آسیب نخاعی زندگی می‌کنند [۱]. آسیب طناب نخاعی یکی از چالش‌های جدی سلامت است و جنبه‌های مختلفی از زندگی را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۲]. نخاع آسیب دیده می‌تواند در اثر آسیب اولیه به دلیل تروما و به دنبال آن آسیب ثانویه به دلیل پاسخ‌های التهابی آسیب ببیند، که منجر به از دست دادن عملکرد به دلیل آسیب بیشتر می‌شود، اما نشان داده شده است که هنوز نوروپلاستیسته نسبتاً کمی در مراحل اولیه وجود دارد [۳].

پاتوژنز آسیب نخاعی شامل آسیب اولیه و ثانویه است. آسیب اولیه به آسیب مکانیکی ناشی از اعصاب نخاعی در هنگام تروما و آسیب ساختاری عروقی غیرقابل برگشت، پارگی آکسون و مرگ سلول‌های عصبی اشاره دارد. درحالی‌که آسیب ثانویه به آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد، سمیت گلوتامات، استرس اکسیداتیو، افزایش کلسیم داخل سلولی، آپوپتوز عصبی و تشکیل اسکار گلیال در مجاورت محل آسیب معطوف می‌شود [۴]. آسیب ثانویه عمدتاً توسط واکنش‌های التهابی ناشی از سلول‌های التهابی ایجاد می‌شود که عملکرد سلول را تغییر داده و باعث مرگ سلول‌های عصبی باقی مانده می‌شود. مرگ عصبی ناشی از آسیب اولیه قابل برگشت نیست [۵] و بنابراین، توجه زیادی بر درمان‌های بالقوه برای آسیب‌های ثانویه آسیب نخاعی متمرکز شده است. آسیب ثانویه باعث تشدید آسیب اولیه از طریق فعال کردن آبخاری از مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مخرب که منجر به وسعت ناحیه تروما می‌شود [۶]. شایان ذکر است که در آسیب نخاعی، واکنش التهابی از طریق سلول‌های میکروگلیا و لوکوسیت‌های گردش خون که بعد از مدت زمان کوتاهی پس از آسیب به محل ضایعه هجوم می‌آورند، شکل می‌گیرد [۷، ۸] از این رو التهاب را عامل اصلی در مرگ سلولی ثانویه بعد از آسیب نخاعی بیان داشته‌اند. از طرف دیگر در سیستم عصبی مرکزی؛ به علت محدودیت در ظرفیت ترمیم آکسون و جایگزینی نورون‌های آسیب دیده و سلول‌های گلیال، اثرات مضر التهاب در این سیستم نسبت به دیگر بافت‌ها بیشتر است و این امر موجب برگشت ناپذیری عملکرد سیستم عصبی مرکزی می‌گردد [۹] بنابراین، در آسیب و ترمیم عصبی آسیب دیده، التهاب نقش اساسی و مهمی دارد [۱۰]. مطالعات مختلف حیوانی نشان داده است که تجویز درمان‌های فعلی آسیب نخاعی مانند داروها،

گلوکوکورونیداسیون، سولفات‌ها شدن و متیلاسیون رزمارینیک اسید هستند که در ادامه از طریق ادرار دفع می‌شوند [۳۰، ۳۱]. در حال حاضر هیچ روش قطعی برای درمان آسیب‌های نخاعی مطرح نشده و درمان‌های انجام شده صرفاً باعث کاهش عوارض ناشی از آسیب‌های نخاعی می‌شود. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات ترمیمی رزمارینیک اسید بر نقیصه تجربی نخاع در مدل حیوانی موش صحرایی نژاد ویستار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تجربی حاصل از پروژه تحقیقاتی دانشجوی دکتری می‌باشد که در سال ۱۴۰۱-۱۴۰۲ در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید چمران اهواز به انجام رسیده است. این پژوهش به وسیله کمیته اخلاق دانشگاه شهید چمران اهواز با شماره EE / 99.3.02.5284/scu.ac.ir تأیید شد.

۱۲ سر موش صحرایی نژاد ویستار بالغ ماده با وزن حدود ۲۵۰ گرم از خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه گردید و به منظور پرهیز از استرس و سازگار شدن با محیط به مدت یک هفته با دسترسی آزاد به غذا و آب و با سیکل روشنایی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت خاموشی در دمای محیط نگهداری ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد تا روز انجام جراحی‌ها نگهداری شدند. به منظور ایجاد نقیصه تجربی نخاع، ابتدا موش‌ها صحرایی با داروی بی‌هوشی کتامین ۱۰٪ با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۲٪ با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بی‌هوش شدند [۳۲]. به منظور ایجاد نقیصه تجربی نخاع یک برش خطی پوست در طول ناحیه پشتی موش صحرایی بر روی ستون مهره از محدوده مهره T9-T12 ایجاد شد. بعد از برش پوست و کند کاری عضلات، سقف مهره T10 توسط دیاموند سایز ۲ دندان‌پزشکی برداشته شد و نیمی از ضخامت نخاع به وسیله قیچی کاستروویجیو برش داده شد. سپس موضع جراحی توسط سرم نرمال سالین با دمای ۳۷ درجه شستشو شد در ادامه عضلات موضع برش با استفاده از نخ بخیه پلی‌گلیکولیک اسید شماره ۴-۰ و پوست با نخ نایلون شماره ۴-۰ بسته شد جهت جلوگیری از عفونت‌های احتمالی روزانه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم انروفلوکساسین (رویان دارو، ایران) به صورت زیرجلدی به مدت ۳ روز تزریق شد و ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن

در بسیاری از گیاهان یا عطرهای طبیعی سنتی مانند رزماری، نعناع، پریلا و مریم‌گلی وجود دارد [۲۱]. RA می‌تواند از سد خونی مغزی عبور کند و نفوذپذیری آن را تحت تاثیر قرار دهد [۲۲] شواهد نشان می‌دهد RA اثرات مفیدی در بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی دارد (۲۳).

RA یک آنتی‌اکسیدان طبیعی است که می‌تواند رادیکال‌های آزاد و اکسیدان‌ها را از بین ببرد. تجویز RA در یک مدل موش، دردهای نوروپاتی را بواسطه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی کاهش داد [۲۴]. علاوه بر این، RA اثرات محافظت‌کننده عصبی قدرتمندی در برابر بیماری پارکینسون، بیماری آلزایمر و بیماری‌های ایسکمیک مغزی اعمال می‌کند [۲۵، ۲۶]. یافته‌ها نشان می‌دهد که RA بهبود وضعیت حرکتی بعد از SCI را بهبود می‌بخشد و به طور قابل توجهی نقص عصبی را کاهش می‌دهد، حفظ نورون‌ها را افزایش داده و آپوپتوز را کاهش می‌دهد. همچنین، RA از فعال شدن میکروگلیا و آزادسازی $IL-6$ ، $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ و MDA جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، مسیریاری $Nrf2$ و $NF-\kappa B$ به عنوان اهداف RA بیان شده است. بنابراین، اثر محافظت‌کننده عصبی رزمارینیک اسید بر روی بیماران دارای آسیب‌های نخاعی، ممکن است به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آن باشد که با تعدیل مسیرهای $Nrf2/HO-1$ و $TLR4/NF-\kappa B$ اعمال می‌شود (۲۷). کوی و همکاران گزارش نمودند که RA دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوز است که از سکنه مغزی ایسکمیک محافظت می‌کند [۲۸] و یک اثر محافظتی عصبی در برابر آسیب سلول‌های عصبی ناشی از هیدروژن پراکسید نشان می‌دهد [۲۹]. اگرچه در مطالعات شانگ و همکاران بیان شده است که RA می‌تواند از نخاع در برابر آسیب محافظت کند ولی هنوز نقش و مکانیسم‌های مولکولی زمینه‌ای RA در آسیب نخاعی نامشخص است [۱۷]. در مطالعات دیگر یافته‌ها نشان می‌دهد که رزمارینیک اسید باعث کاهش درد و رفتارهای ناشی از آسیب‌های نوروپاتی شده است [۲۴].

مطالعات نشان داد که رزمارینیک اسید به راحتی در دستگاہ گوارش جذب می‌شود، با انتشار غیرفعال از اپیتلیوم روده عبور می‌کند و در نیم ساعت پس از تجویز به حداکثر غلظت پلاسمایی خود می‌رسد. متابولیت‌های تشکیل شده شامل

عصبی استفاده شد. مقاطع بافتی با استفاده از میکروسکپ نوری مدل نیکون، (ECLIPSE E200, Japan) با بزرگنمایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت و تصاویر مقاطع بافتی توسط نرم افزار Image J مورد آنالیز قرار گرفت.

با توجه به نتایج آزمون همگونی واریانس و آزمون توزیع نرمال داده‌ها (Kolmogorov-Smirnoff) داده‌های بدست آمده کمی، به صورت میانگین و انحراف استاندارد ارائه و اختلاف معنی دار بین گروه‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) و $\alpha=0.05$ ، در سطح معنی داری $p > 0.05$ توسط بسته نرم افزاری SPSS ویرایش ۱۸ برآورد گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمون عملکردی - حرکتی باسو - بتی - برسنهان از روز دوم تا روز ۵۶ بعد از ایجاد نقیصه نخاعی در جدول شماره ۱ آمده است. بر اساس این نتایج در روزهای دوم و هفتم اختلاف معنی داری بین گروه‌های کنترل و رزمارینیک اسید یافت نشد ($p > 0.05$). اما در روز چهاردهم و بیست و یکم اختلاف بین دو گروه بصورت معنی دار بود ($p < 0.05$). در روز ۲۸ نیز اختلاف عملکردی حرکتی بین دو گروه دریافت کننده رزمارینیک اسید نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود ($p > 0.05$). بررسی نتایج به دست آمده در روزهای ۳۵، ۴۲، ۴۹ و ۵۶ بعد از ایجاد نقیصه تجربی نخاع نشان داد که گروه تحت درمان با رزمارینیک اسید نسبت به گروه کنترل از نظر توانایی حرکتی نتایج بهتری داشته و اختلاف معنی داری بین دو گروه دیده شد ($p < 0.05$).

کتوپروفن (رویان دارو، ایران) به صورت زیر جلدی به مدت ۳ روز تزریق شد [۳۳، ۳۴]. تعداد ۱۲ موش ویستار در ۲ گروه با جمعیت ۶ تایی تقسیم شده، گروه اول به عنوان گروه کنترل انتخاب شده و هیچ نوع درمانی در این گروه صورت نپذیرفت و در گروه دوم به عنوان گروه رزمارینیک اسید (سیگما، آمریکا)، با دوز ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم در روز به صورت خوراکی و محلول در آب آشامیدنی روزانه به موش‌ها داده شد.

جهت ارزیابی حسی - حرکتی به دنبال ایجاد نقیصه تجربی نخاع در موش‌های مورد آزمایش توسط روش Basso, Beattie and Bresnahan یا BBB در روزهای ۴۲، ۴۹، ۵۶، ۳۵، ۲۸، ۲۱، ۱۴، ۷، ۲، ۰ ارزیابی صورت گرفت. امتیاز دهی در این روش به این گونه می باشد که حرکت مفاصل به همراه حرکت جزئی اندام حرکتی خلفی و یا عدم حرکت اندام خلفی امتیاز ۰ تا ۷، قدم زدن نا هماهنگ امتیاز ۸ تا ۱۳ و راه رفتن هماهنگ و منظم بر روی اندام حرکتی خلفی و قدامی امتیاز ۱۴ تا ۲۱ را دریافت خواهد کرد. امتیازدهی توسط ۲ ناظر ثبت شد و در صورت عدم تفاهم نظر دو ناظر کمترین امتیاز ثبت گردید.

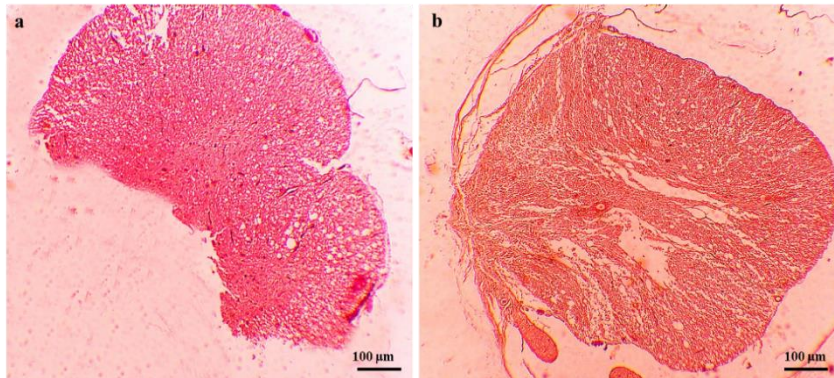
جهت ارزیابی هیستومورفومتری (حجم ضایعه و میلینه شدن رشته‌های عصبی) در انتهای دوره نگهداری ۵۶ روزه، موش‌ها با استفاده از دوز بالای بیپوشی آسان کشی شده و قطعات مورد نظر نخاع نمونه برداری شد. نمونه‌ها در محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شده و پس از تثبیت نمونه بافتی، و تهیه مقطع به منظور بررسی کمی و کیفی بافت شناسی از دو روش رنگ آمیزی هما توکسیلین اتوزین جهت تعیین حجم ضایعه و رنگ آمیزی لوکسال فست بلو به منظور تعیین در صد میلینه شدن رشته‌های

جدول ۱ - نتایج آزمون عملکردی حرکتی BBB در دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل از روز دوم تا روز پنجاه و شش بعد از ایجاد نقیصه تجربی نخاع

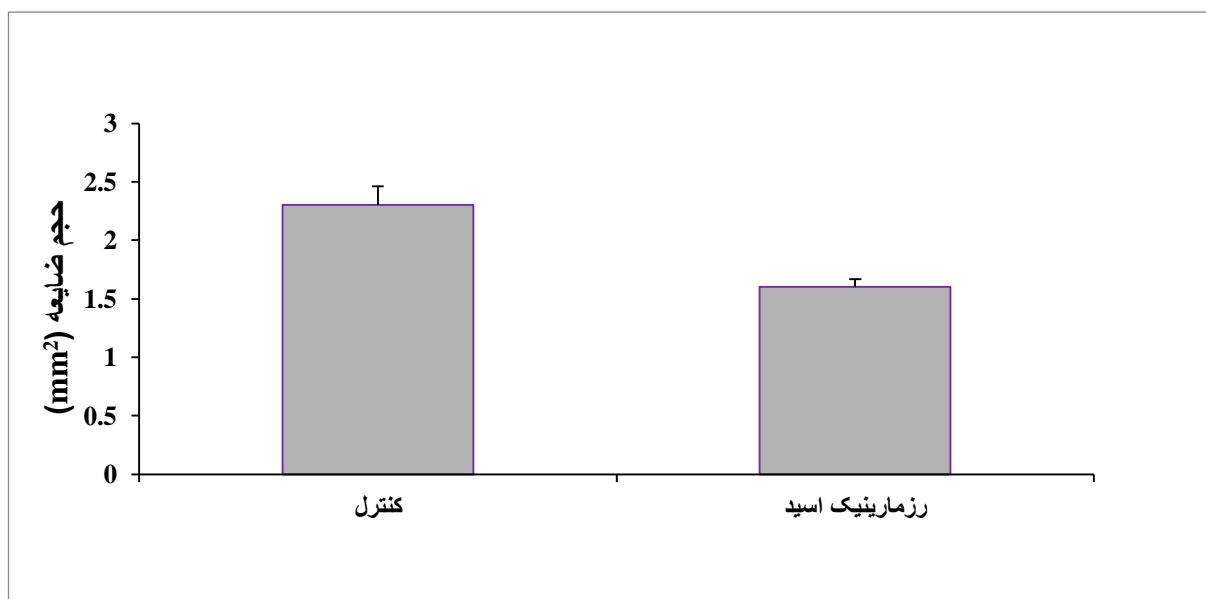
p-value	Z	میانگین	مقایسه‌ها
0.54	-1.4228482	0.50	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز دوم
0.219	-0.9978987	3.40	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز هفتم
.002	-0.5436423	6.50	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز چهاردهم
.002	0.1597224	11.30	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز بیست یکم
.062	0.4234842	13.10	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز بیست هشتم
.000	0.8044734	15.70	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز سی و پنج
.000	0.9363543	16.60	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز چهل دو
.000	0.9949680	17.00	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز چهل نه
.000	1.1415023	18.00	مقایسه دو گروه رزمارینیک اسید و کنترل در روز پنجاه و شش

نخاع و کمترین میزان ترمیم در گروه کنترل با بیشترین حجم ضایعه (به صورت میانگین $2/3$ میلیمتر مکعب) مشاهده گردید (تصویر شماره ۱ و ۲) ($P < 0.0001$). همچنین نتایج به دست آمده از بررسی تصاویر مقاطع بافتی رنگ آمیزی شده با رنگ آمیزی لوکسال فست بلو در دو گروه کنترل و رزمارینیک اسید نشان دهنده تفاوت معنی دار در میزان میلینه شدن رشته های عصبی در محل تقیصه تجربی نخاع در ۵۶ روز بعد از عمل در دو گروه می باشد ($P < 0.0001$). میزان میلینه شدن رشته های عصبی بر اساس درصد در محل عارضه نخاعی در گروه رزمارینیک اسید به صورت میانگین ۱۱ درصد و در گروه کنترل $1/4$ درصد مشاهده شد (تصویر شماره ۲ و ۳).

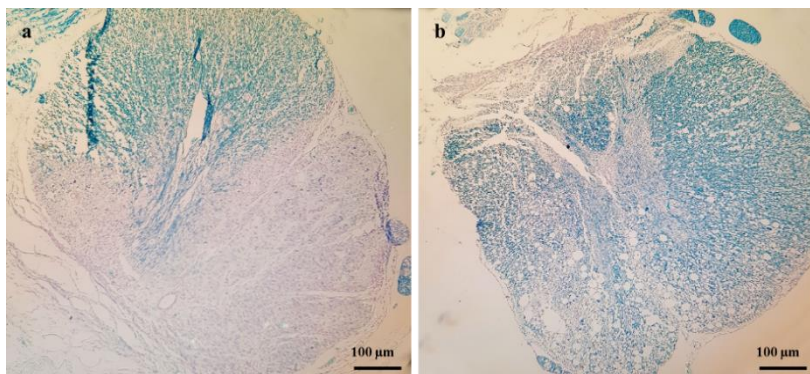
نتایج بدست آمده از مشاهده میکروسکوپی از مقاطع بافتی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین - انوزین نشان داد که در گروه کنترل، در محل عارضه سلول های دژنره و واکوئله شده بافتی، سلول های التهابی و بافت فیروز شده تشکیل شده است که گواه بر عدم رخداد ترمیم مناسب در این گروه می باشد و در گروه رزمارینیک اسید به دلیل حضور تعداد پایین سلول های التهابی ترمیم بافتی بهتر بوده است. همچنین نتایج به دست آمده از بررسی تصاویر در دو گروه کنترل و رزمارینیک اسید نشان دهنده تفاوت معنی دار در حجم ضایعه نخاع در دو گروه می باشد. به این صورت که روند ترمیم بهتری در گروه رزمارینیک اسید با کمترین حجم ضایعه (صورت میانگین $1/6$ میلیمتر مکعب) در



تصویر ۱: تصاویر میکروسکوپی از محل ترمیم آسیب نخاعی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین - انوزین (H&E) در روز ۵۶ پس از آسیب. a گروه کنترل، b گروه رزمارینیک اسید. بزرگنمایی ۴X

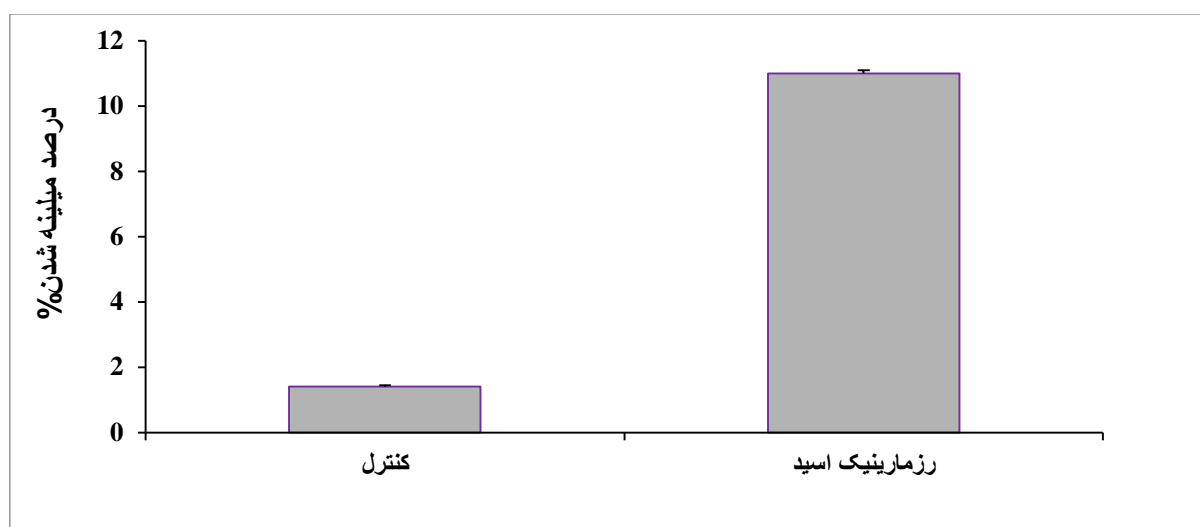


تصویر ۲: نمودار میزان حجم ضایعه نخاعی در محل آسیب در روز ۵۶ بعد از ایجاد عارضه نخاعی.



تصویر ۳: تصاویر میکروسکوپی از محل ترمیم آسیب نخاعی با استفاده از لوکسال فست بلو در روز ۵۶ پس از آسیب. a گروه کنترل، b گروه رزمارینیک اسید. بزرگمایی

۴X



تصویر ۴: نمودار درصد میلینه شدن رشته‌های عصبی در محل نقیصه تجربی در روز ۵۶ بعد از ایجاد عارضه نخاعی.

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش به بررسی اثر ترمیمی رزمارینیک اسید بر ضایعه تجربی نخاع پرداخته شد. نتایج حاصله در تایید یافته‌های قبلی مبنی بر اثر ترمیمی رزمارینیک اسید در ضایعات نخاعی می‌باشد. بر اساس یافته‌های ما رزمارینیک اسید باعث بهبود عملکردی - حرکتی در موش‌های صحرایی دارای ضایعات نخاعی می‌شود. همچنین بر اساس یافته‌های بافت‌شناسی، رزمارینیک اسید باعث کاهش التهاب و ترمیم سریعتر در محل آسیب نخاعی می‌شود.

آسیب نخاعی یک مشکل سلامت عمومی بوده که با از دست دادن ناگهانی عملکردهای حسی و حرکتی همراه می‌باشد. این اتفاق فاجعه باری است که عمیقاً می‌تواند مسیر زندگی بیمار را با تاثیر بر جنبه‌های اقتصادی، فرهنگی و اجتماعی تحت تاثیر قرار دهد. در حال حاضر روش‌های اصلی برای درمان آسیب

نخاعی شامل درمان جراحی، درمان دارویی، اکسیژن درمانی هایپرباریک و فیزیوتراپی است. با این حال، اثرات درمانی و نتیجه در بیماران مبتلا به آسیب نخاعی رضایت بخش نیست. این امر مستلزم مطالعه روش‌های جدید و موثر برای درمان آسیب نخاعی است. بعلاوه استفاده از روش‌های طب سنتی در کنار طب نوین می‌تواند اثرات موثری در روند بهبود بیماری‌های عصبی داشته باشد. در این راستا ژانگ و همکارانش بیان داشتند که استفاده از گیاهان دارویی می‌تواند جایگزین مناسبی به منظور درمان عارضه‌های نخاعی باشد [۱۷]. رزمارینیک اسید یک ترکیب گیاهی با خاصیت ضدالتهابی است که در درمان بیماری‌های عصبی همچون پارکینسون، آلزایمر و ایسکمی مغزی مورد استفاده قرار گرفته است [۳۵].

فعالیت ضد التهابی RA عمدتاً به مهار فعالیت‌های سیکلوآکسیژناز و لیپوآکسیژناز و فعال‌سازی مسیر کمپلمان نسبت

را مهار کرده و به طور قابل توجهی نقیصه عصبی را ۷ روز پس از آسیب نخاعی بهبود بخشید که با یافته‌های ما در مورد رزمارینیک اسید مطابقت دارد [۴۰]. ژان و همکارانش بیان داشتند که استفاده از عصاره پورپورین در ضایعات نخاعی موشهای صحرایی، معنی‌داری امتیاز BBB را در موش‌های نخاعی افزایش می‌دهد، آسیب بافت‌شناسی نخاع و از دست دادن نورون را کاهش داده، فعال‌سازی سلول‌های گلیال را مهار کرده، التهاب و آپوپتوز سلولی را در نخاع آسیب‌دیده مهار می‌کند که مشابه مطالعات بر روی رزمارینیک اسید و کورکومین است [۴۱].

در مطالعه رزمیان و همکاران در سال ۲۰۲۳ بیان شده است که عصاره بوسیلیک اسید باعث افزایش میلینه شدن و کاهش حجم ضایعه در محل آسیب نخاعی در موش‌های صحرایی مبتلا به آسیب نخاعی شده است که با مطالعات ما بر روی رزمارینیک اسید مطابقت دارد [۴۲].

به طور کلی نتایج این مطالعه و مطالعات پیشین نشان می‌دهد که رزمارینیک اسید با داشتن خواص ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوزی پتانسیل خوبی برای درمان ضایعات نخاعی دارد. رزمارینیک اسید با کاهش چشم‌گیر حجم عارضه نخاعی، افزایش معنی‌دار میلینه شدن رشته‌های عصبی در محل آسیب نخاعی و بهبود عملکرد حرکتی تاثیر مثبتی در روند بهبود ضایعه نخاعی در مدل موش آزمایشگاهی نشان داد. با این حال، تحقیقات بیش‌تری برای درک بهتر مکانیسم‌های زیربنایی اثرات مشاهده شده و تعیین دوز و مدت زمان بهینه درمان موردنیاز است. علاوه بر این، آزمایش‌های بالینی در انسان برای تعیین ایمنی و اثربخشی رزمارینیک اسید برای درمان آسیب‌های نخاعی موردنیاز است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان‌نامه دانشجوی دکتری تخصصی بوده و هزینه تحقیقات از محل اعتبارات پژوهانه سال ۱۴۰۲ معاونت پژوهشی دانشگاه شهیدچمران اهواز تامین گردیده است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر حمایت‌های مالی اعلام می‌دارند.

داده می‌شود [۳۶]. در مطالعات یون و همکاران، در سال ۲۰۰۳ بیان شده است که اسید رزمارینیک به دلیل ظرفیت حذف رادیکال‌های آزاد، اثر ترمیمی در درمان بیماری‌های التهابی مانند آرتریت روماتوئید را دارا می‌باشد [۳۷]. در تحقیقات ژان ژون و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثر درمانی و مکانیسم مولکولی رزمارینیک اسید در آسیب‌های حاد نخاعی بررسی گردید. آن‌ها نشان دادند که رزمارینیک اسید بهبود حرکتی را پس از ضایعه نخاعی بهبود می‌بخشد و به طور قابل توجهی نقص عصبی را کاهش می‌دهد، حفظ نورون‌ها را افزایش داده و آپوپتوز را کاهش می‌دهد. همچنین، رزمارینیک اسید از فعال شدن میکروگلیا و آزادسازی TNF- α ، IL-6، و IL-1 β و MDA جلوگیری نموده و همچنین باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ Nrf2 و NF- κ B می‌شود [۲۷]. رهبردار و همکاران در مطالعه‌ای بر روی موش‌های صحرایی با آسیب مزمن عصب سیاتیک، به بررسی اثر ضددردی عصاره اتانولی رزمارینیک اسید پی بردند [۳۸].

بر اساس یافته‌های ما رزمارینیک اسید باعث بهبود میلینه شدن رشته‌های عصبی در محل ضایعه نخاعی شده است. در همین راستا در مطالعات لی و همکارانش، تزریق صفاقی رزمارینیک اسید به موش‌های صحرایی مبتلا به هایپوکسی و ایسکمی مغزی باعث بهبود اختلالات حرکتی، اضطراب، یادگیری و حافظه فضایی در روز ۲۲ بعد از آسیب شده است. همچنین رزمارینیک اسید باعث افزایش تعداد سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت در ناحیه زیر بطنی گردیده و باعث کاهش از دست رفتن پروتئین پایه میلین و از دست رفتن غشای میلین در جسم پینه‌ای مغز شده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که رزمارینیک اسید اختلال عملکرد شناختی را پس از آسیب هیپوکسی / ایسکمی با بهبود میلیناسیون مجدد در جسم پینه‌ای بهبود بخشیده است [۳۹].

در مطالعه‌ای که توسط لین و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بر روی اثر عصاره کورکومین، به عنوان عامل تاثیرگذار در مهار التهاب، بر روی آسیب‌های نخاعی موش‌های صحرایی انجام شد نشان داده شده است که نمرات BBB برای اندام عقبی آسیب‌دیده پس از آسیب نخاعی در گروه تحت درمان با کورکومین در مقایسه با گروه کنترل، روزهای ۳ و ۷ به طور قابل توجهی بهبود یافت. کورکومین آپوپتوز و از دست دادن نورون و فعال شدن آستروسیت

- منابع
- [13] Khorasanizadeh M, Yousefifard M, Eskian M, Lu Y, Chalangari M, Harrop JS, et al. Neurological recovery following traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurosurgery: Spine*. 2019; 30(5): 683-99.
- [14] Htwe O, Hussain RI, Naicker AS. Challenges in Managing Severe Lower Limb Spasticity Associated with Bilateral Hip Joints Subluxation. *Eur J Gen Med*. 2016; 13(2): 165-7.
- [15] Honmou O, Yamashita T, Morita T, Oshigiri T, Hirota R, Iyama S, et al. Intravenous infusion of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in spinal cord injury patients: 13 case series. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2021; 203: 106565.
- [16] Chen X, Chen X, Huang X, Qin C, Fang Y, Liu Y, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition provides multi-target therapeutic effects in rats after spinal cord injury. *Molecular neurobiology*. 2016; 53: 1565-78.
- [17] Zhang Q, Yang H, An J, Zhang R, Chen B, Hao D-J. Therapeutic effects of traditional Chinese medicine on spinal cord injury: a promising supplementary treatment in future. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016; 2016.
- [18] Kuźniak E, Kornas A, Kaźmierczak A, Rozpądek P, Nosek M, Kocurek M, et al. Photosynthesis-related characteristics of the midrib and the interveinal lamina in leaves of the C3-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Annals of Botany*. 2016; 117(7): 1141-51.
- [19] Scarpati ML. Oriente, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Ric Sci*. 1958; 28: 2329-33.
- [20] Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H. Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2020; 393: 1779-95.
- [21] Wang Y-S, Shen C-Y, Jiang J-G. Antidepressant active ingredients from herbs and nutraceuticals used in TCM: pharmacological mechanisms and prospects for drug discovery. *Pharmacological research*. 2019; 150: 104520.
- [22] Sánchez-Martínez JD, Valdés A, Gallego R, Suárez-Montenegro ZJ, Alarcón M, Ibañez E, et al. Blood-Brain Barrier Permeability Study of Potential Neuroprotective Compounds Recovered From Plants and Agri-Food by-Products. *Frontiers in Nutrition*. 2022; 9: 924596.
- [1] Quadri SA, Farooqui M, Ikram A, Zafar A, Khan MA, Suriya SS, et al. Recent update on basic mechanisms of spinal cord injury. *Neurosurgical Review*. 2020; 43: 425-41.
- [2] Brunner LS. *Brunner & Suddarth's textbook of medical-surgical nursing: Lippincott Williams & Wilkins*; 2010.
- [3] Hashimoto S, Nagoshi N, Shinozaki M, Nakanishi K, Suematsu Y, Shibata T, et al. Microenvironmental modulation in tandem with human stem cell transplantation enhances functional recovery after chronic complete spinal cord injury. *Biomaterials*. 2023; 295: 122002.
- [4] Özdemir ÜS, Nazıroğlu M, Şenol N, Ghazizadeh V. Hypericum perforatum attenuates spinal cord injury-induced oxidative stress and apoptosis in the dorsal root ganglion of rats: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Molecular neurobiology*. 2016; 53: 3540-51.
- [5] Silva NA, Sousa N, Reis RL, Salgado AJ. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in neurobiology*. 2014; 114: 25-57.
- [6] Dalbayrak S, Yaman O, Yılmaz T. Current and future surgery strategies for spinal cord injuries. *World journal of orthopedics*. 2015; 6(1): 34.
- [7] Popovich PG, Jones TB. Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends in pharmacological sciences*. 2003; 24(1): 13-7.
- [8] David S, Greenhalgh AD, López-Vales R. Role of phospholipase A2s and lipid mediators in secondary damage after spinal cord injury. *Cell and tissue research*. 2012; 349(1): 249-67.
- [9] Silver J, Schwab ME, Popovich PG. Central nervous system regenerative failure: role of oligodendrocytes, astrocytes, and microglia. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015; 7(3): a020602.
- [10] Bastien D, Landete VB, Lessard M, Vallieres N, Champagne M, Takashima A, et al. IL-1 α gene deletion protects oligodendrocytes after spinal cord injury through upregulation of the survival factor Tox3. *Journal of Neuroscience*. 2015; 35(30): 10715-30.
- [11] Katoh H, Yokota K, Fehlings MG. Regeneration of spinal cord connectivity through stem cell transplantation and biomaterial scaffolds. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2019; 13: 248.
- [12] O'Shea TM, Burda JE, Sofroniew MV. Cell biology of spinal cord injury and repair. *The Journal of clinical investigation*. 2017; 127(9): 3259-70.

- [23] Ravaria P, Saxena P, Lakshmi BS S, Ranjan V, Abidi SWF, Saha P, et al. Molecular mechanisms of neuroprotective offerings by rosmarinic acid against neurodegenerative and other CNS pathologies. *Phytotherapy Research*. 2023.
- [24] Rahbardar MG, Amin B, Mehri S, Mirnajafi-Zadeh SJ, Hosseinzadeh H. Rosmarinic acid attenuates development and existing pain in a rat model of neuropathic pain: An evidence of anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *Phytomedicine*. 2018; 40: 59-67.
- [25] Zhang M, Yan H, Li S, Yang J. Rosmarinic acid protects rat hippocampal neurons from cerebral ischemia/reperfusion injury via the Akt/JNK3/caspase-3 signaling pathway. *Brain research*. 2016; 1657: 9-15.
- [26] Bigford GE, Del Rossi G. Supplemental substances derived from foods as adjunctive therapeutic agents for treatment of neurodegenerative diseases and disorders. *Advances in Nutrition*. 2014; 5(4): 394-403.
- [27] Ma Z, Lu Y, Yang F, Li S, He X, Gao Y, et al. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect on spinal cord injury by suppressing oxidative stress and inflammation via modulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF- κ B pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2020; 397: 115014.
- [28] Cui H-Y, Zhang X-J, Yang Y, Zhang C, Zhu C-H, Miao J-Y, et al. Rosmarinic acid elicits neuroprotection in ischemic stroke via Nrf2 and heme oxygenase 1 signaling. *Neural regeneration research*. 2018; 13(12): 2119.
- [29] Ghaffari H, Venkataramana M, Ghassam BJ, Nayaka SC, Nataraju A, Geetha N, et al. Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. *Life Sciences*. 2014; 113(1-2): 7-13.
- [30] Konishi Y, Kobayashi S. Transepithelial transport of rosmarinic acid in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2005; 69(3): 583-91.
- [31] Baba S, Osakabe N, Natsume M, Terao J. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life sciences*. 2004; 75(2): 165-78.
- [32] Davis JA. Mouse and rat anesthesia and analgesia. *Current protocols in neuroscience*. 2008; 42(1): A. 4B. 1-A. 4B. 21.
- [33] Santos DRd, Teixeira RKC, Araújo NPd, Calvo FC, Duarte TB, Ataíde LAPd, et al. A new anesthetic protocol to medullary nerve roots access in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2021; 36.
- [34] Ye Y, Feng T-t, Peng Y-r, Hu S-q, Xu T. The treatment of spinal cord injury in rats using bone marrow-derived neural-like cells induced by cerebrospinal fluid. *Neuroscience letters*. 2018; 666: 85-91.
- [35] Iswandana R, Pham B, Van Haaften W, Luangmonkong T, Oosterhuis D, Mutsaers H, et al. Organ-and species-specific biological activity of rosmarinic acid. *Toxicology in Vitro*. 2016; 32: 261-8.
- [36] Sahu A, Rawal N, Pangburn MK. Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated C3b. *Biochemical pharmacology*. 1999; 57(12): 1439-46.
- [37] Youn J, Lee K-H, Won J, Huh S-J, Yun H-S, Cho W-G, et al. Beneficial effects of rosmarinic acid on suppression of collagen induced arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 2003; 30(6): 1203-7.
- [38] Rahbardar MG, Amin B, Mehri S, Mirnajafi-Zadeh SJ, Hosseinzadeh H. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 86: 441-9.
- [39] Li M, Cui M-M, Kenekukwu NA, Gu Y-W, Chen Y-L, Zhong S-J, et al. Rosmarinic acid ameliorates hypoxia/ischemia induced cognitive deficits and promotes remyelination. *Neural Regeneration Research*. 2020; 15(5): 894.
- [40] Lin M-S, Lee Y-H, Chiu W-T, Hung K-S. Curcumin provides neuroprotection after spinal cord injury. *Journal of Surgical Research*. 2011; 166(2): 280-9.
- [41] Zhang D, Ma G, Hou M, Zhang T, Chen L, Zhao C. The neuroprotective effect of puerarin in acute spinal cord injury rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016; 39(3): 1152-64.
- [42] Razmian N, Hoveizi E, Naddaf H. An investigation on the reparative effects of boswellic acid on experimental spinal cord injury in a Wistar rat model. *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*. 2023; 17(67): 199-209.

مقاله مروری

مروری بر فرآیندهای تولید چرم مبتنی بر میسلیموم قارچها

شهرزاد صادقی امجد^۱، حورا دادگستر^۲، محدثه لاری پور^{۳*}

^۱ دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

^۲ دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

^{۳*} دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۳

چکیده

با توسعه روزافزون جهانی علم بیوتکنولوژی و افزایش جمعیت، آدمی همواره به دنبال کاهش خسارات وارده به محیط زیست بواسطه حیات خویش بوده است، قارچها و گیاهان مناسبترین گزینهها برای تولید و توسعه زیستی مواد پایدار هستند. تجدیدپذیر بودن، داشتن ایمنی بالا برای محیطزیست، ارزان بودن، زیست تخریب پذیر بودن و بومی بودن مواد زیستی، نقطه عطف مهمی در مهندسی زیستی مواد است، عملکرد اصلی قارچها در تولید آنزیمهای مختلف و تاثیر آن بر روی انواع سوپسترا می باشد که می توانند این سوپسترا را به بستری با استحکام و تحمل فشار بالا تبدیل کنند، گونههای مختلفی از قارچهای رشته ایی و کلاه دار براساس عملکرد ذکر شده در فرایند تولید چرم دخیل هستند. تولید انبوه آنها طی کشت (به سه روش جامد، مایع و غوطه ور)، جداسازی زیست توده حاصله طی فرایندهای خاص، خشک کردن، شکل دهی نهایی و جایگزینی ترکیب حاصله در صنعت چرم می تواند در کاهش بخش بزرگی از خسارات وارده به محیطزیست مثمرتر باشد.

کلیدواژه ها: چرم، قارچ، چرم مبتنی بر میسلیموم، ماتریکس زیستی.



چکیده گرافیکی

مقدمه

ضدکلسترول، ضدسرطانی، ضد میکروبی و ... را نشان می‌دهند. [۴، ۱۲-۱۴] این ترکیبات مرتبط با قارچ‌ها، به عنوان عوامل درمانی از جمله عوامل ضدپیری استفاده می‌شوند. [۴] قارچ‌ها حاوی آنزیم‌هایی نیز هستند که به طور گسترده در صنایع غذایی، سوخت‌های زیستی، شوینده‌ها و ترکیبات زیست فعال قارچی در دامپزشکی و پزشکی استفاده می‌شوند. [۱۳، ۱۴]

میسلیموم

میسلیموم قسمت رویشی یک قارچ است که ماده‌ای سریع‌الرشد، ایمن و بی‌اثر به عنوان ماتریکس زیستی می‌باشد. [۱، ۱۵، ۱۶] میسلیموم شبکه متراکمی از رشته‌های نازک به نام هیف است که رشد می‌کند و به یک ماده جامد تبدیل می‌شود. کیتین قارچی، در دیواره‌های سلولی هیف‌ها موجود می‌باشد که در شکل ۱ آورده شده است. میسلیموم‌ها رشته‌های ریز سفید با ساختار سه بعدی، به زیرلایه‌های آلی حمله کرده و آنها را تجزیه می‌کنند. در طول رشد میسلیموم، سلولز، لیگنین یا همی سلولز و ... بعنوان سوبسترا می‌توانند توسط قارچ‌ها از طریق ترشح آنزیم‌های مختلفی مانند لاکتاز، لیگنین پراکسیداز و پراکسیداز منگنز تجزیه شوند. میسلیموم تقریباً در هر نوع ضایعات کشاورزی از جمله خاکاره و پوست پسته و ... قابل رشد است، مواد مشتق شده از آن پتانسیل تبدیل شدن به ماده انتخابی برای کاربردهای مختلف را دارند، زیرا آنها غیرسمی، قابل بازیافت و کم هزینه هستند. [۱، ۴، ۱۷]

الیاف میسلیموم قارچ

میسلیموم قارچ، مواد بستر را در حین رشد به هم متصل کرده و امکان تولید ساختارهایی مانند ورقه‌ها، کامپوزیت‌ها و ماتریکس‌های چرم مانند را فراهم می‌کند. استحکام کامپوزیت‌های مبتنی بر میسلیموم قارچ‌ها، به ویژه گونه‌های مختلف بازیدیومیست‌ها^۱ مانند *ترامتس ورسیکالر*^۲ و *پلوروتوس استراتوس*^۳ ساخته می‌شوند بسیار بالا می‌باشد. گونه‌های گانودرما لوسیدوم^۴ و گانودرما اوروجنز^۵ و پلوروتوس استراتوس

باتوجه به سرعت رشد جمعیت، نیاز به پیشرفت تکنولوژی افزایش یافته است، در این راستا تولید و توسعه فرآیندهایی که کم‌ترین میزان خسارات را به محیط زیست وارد کنند و از اقتصاد دایره‌ای پیروی کنند مورد توجه قرار گرفته است. [۱، ۲] هدف اقتصاد دایره‌ای تولید کالاها و خدمات پایدار با الگوی مصرف صحیح منابع و به حداقل رساندن ضایعات است. [۱] رشد تساعدی جمعیت جهانی، افزایش تقاضای غذا و محصولات کشاورزی و به دنبال این‌ها ضایعات و محصولات جانبی کشاورزی را افزایش داده است. [۳] در اقتصاد دایره‌ای، روند بازیافت و استفاده از محصولات جانبی مورد توجه قرار می‌گیرد. [۷]

در نظر گرفتن اقتصاد دایره‌ای محققان را به جستجوی جایگزین‌های پایدار برای محصولات مبتنی بر منابع تجدیدناپذیر به منظور کاهش استرس‌های زیست محیطی، سوق داده است. [۱، ۴] استراتژی توسعه جایگزین‌های پایدار جهانی به سمت مواد مبتنی بر زیست هدف گذاری شده است. [۵-۷] در طراحی جایگزین‌های پایدار ویژگی‌هایی چون قابل بازیافت بودن، در دسترس بودن مواد اولیه، سازگاری با محیط زیست، مقرون به صرفه بودن مورد توجه قرار می‌گیرد. [۱، ۴]

قارچ‌ها و گیاهان مناسب‌ترین گزینه‌ها برای تولید و توسعه مواد پایدار زیستی هستند و با دارا بودن دو ویژگی تجدیدپذیر بودن و ایمن بودن برای محیط زیست به نقطه عطفی در مهندسی زیستی مواد تبدیل شده‌اند. [۶، ۸، ۹] رشد قارچ‌ها به دنبال استفاده از ضایعات و محصولات جانبی کشاورزی به عنوان ماده اولیه و قابل بازیافت بودن، از نظر اقتصادی و علمی توجه‌ها را به خود جلب کرده است. [۳، ۵]

قارچ‌ها

قارچ‌ها یوکاریت‌هایی هتروتروف، شامل مخمرها، قارچ‌های کلاهدار و قارچ‌های رشته‌ای هستند. [۱۰، ۱۱] قارچ‌ها از متابولیت‌های ثانویه با ارزش زیادی مانند پلی ساکاریدها، اسیدهای چرب، ترپنوئیدها و ترکیبات فنلی تشکیل شده‌اند. متابولیت‌های ثانویه قارچ فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضدویروسی، ضدالتهابی، ضدانعقادی،

¹ Basidiomycota

² *Trametes versicolor*

³ *Pleurotus ostreatus*

⁴ *Ganoderma lucidum*

⁵ *Ganoderma oregonense*

صنعت ساخت‌وساز

کامپوزیت‌های ساخته شده بر اساس میسلیم با خصوصیتی مانند جذب حرارت و صوت می‌توانند جایگزین فوم‌ها، الوار و پلاستیک برای کاربردهایی مانند عایق، پوشش، کفپوش، کابینت و ... شوند. هزینه کم، سادگی ساخت و پایداری زیست محیطی این مواد نشانگر اهمیت آن‌ها در آینده ساخت‌وساز سبز خواهد بود. [۳]

صنعت خودروسازی

کامپوزیت‌های مشتق شده از میسلیم‌های قارچی به‌عنوان

جایگزین‌هایی برای محصولات پتروشیمی در صنعت خودرو سازی توصیف شده‌است. [۴] از جمله آنها می‌توان به استفاده از مخلوط قارچ و مایع برای فرآیند قالب‌گیری تزریقی اشاره کرد که به کاهش استفاده از پلاستیک در وسایل نقلیه کمک می‌کند. همچنین در تزئینات داخل خودرو مانند روکش صندلی، آینه و ... قابل استفاده خواهد بود. [۲]

صنعت الکترونیک

بردهای مدارالکترونیکی مشتق شده از میسلیم قارچ با تلقیح در بستر و محلولی حاوی نمک‌های فلزی تهیه می‌شود، نمک‌های فلزی می‌توانند میسلیم‌های قارچ را تغییر دهند تا یک الگویسیم کشی برای مدارالکترونیکی روی آن به وجود آید. [۲]

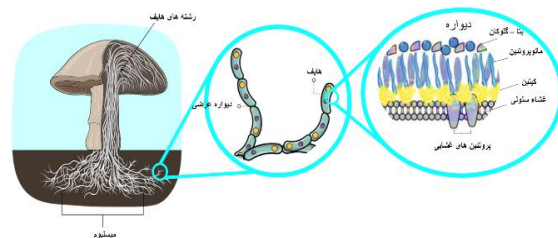
صنعت نساجی

مواد مختلف مشتق شده از قارچ‌ها برپایه میسلیم و نوع بستر در صنعت نساجی دارای کاربردهای متنوعی چون تولید کاغذ، پوشش بسته‌بندی مواد غذایی، پانسمان‌های ضد میکروبی، چسب‌های پوششی، مواد جاذب و همچنین تولید چرم جایگزین می‌باشد. [۲، ۶، ۱۹، ۱۵]

چرم جایگزین

تقاضا برای چرم پایدار به عنوان یک ماده لوکس، برای حل مشکلات محیط‌زیستی و اخلاقی صنعت چرم در حال افزایش است. [۶، ۷، ۹، ۱۹، ۲۰] صنعت جهانی چرم با نکات منفی

توانایی تشکیل ساختارهایی شبیه لانه زنبور با انعطاف‌پذیری بالا دارند. ارگانسیم‌های سه جنس پلی پوروس^۱، فومز^۲ و گانودرما نیز در تولید میسلیم بسیار کاربردی هستند. [۲، ۴، ۶، ۱۱]



شکل ۱- ساختار میسلیم و هیف در قارچ‌ها

کاربرد قارچ‌ها در بیوتکنولوژی

میکروارگانسیم‌ها را می‌توان به دو شکل در تولید مواد به کاربرد: با روش غیرمستقیم، که در این روش آنزیم‌ها و متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از میکروارگانسیم‌ها اهمیت دارند [۱۰] و در روش مستقیم از خود میکروارگانسیم و اجزاء ساختاری آنها مانند استفاده از میسلیم قارچ‌های کلاه‌دار و رشته‌ای در تولید مواد زیستی، استفاده می‌شود. [۱، ۱۸]

مفهوم استفاده از میسلیم قارچ‌های رشته‌ای و کلاه‌دار به عنوان ماتریکس زیستی در سال ۲۰۰۷ توسط صاحبان شرکت Evocative Eben Bayer و Gavin McIntyre آغاز شد. [۱] میسلیم قارچ‌ها با خاصیت اتصالاتی که دارد ترکیبات بستر را به یکدیگر متصل کرده و ساختاری منسجم را ایجاد می‌کنند. [۱، ۳] این ساختارهای منسجم با تفاوت‌های بالقوه در نوع قارچ، نوع بستر، نوع آنزیم‌های دخیل و شرایط محیطی دارای خواص فیزیکی، مکانیکی و شیمیایی مختلفی هستند. [۵، ۱۶] مواد مشتق شده از میسلیم دارای چندین مزیت کلیدی نسبت به مواد مصنوعی معمولی، از جمله چگالی کم، تنوع بالا، صرف انرژی کم، هزینه کم و سازگاری با محیط‌زیست هستند. [۲، ۴، ۱۵] بر همین اساس محصولات حاصل طیف گسترده‌ای از مواد را شامل می‌شوند و در صنایع مختلفی کاربرد دارند که در شکل ۲ به انواعی از آنها اشاره شده‌است. [۵، ۸]

^۱ Polyporus
^۲ fomes

توسعه تولید جایگزین‌های پایدار چرم حائز اهمیت است. [۲۰] این نگرانی‌ها اکتشاف مواد جایگزین برای چرم‌های مبتنی بر حیوانات را به دنبال داشته که به انواعی از آن‌ها در جدول ۱ پرداخته شده است. [۲۱، ۱۹]

چرم قارچ یا چرم مبتنی بر میسلیموم به عنوان "موادسبز" با روش‌های زیست‌سازگار، بدون استفاده از مواد آلاینده شیمیایی و تنها از میسلیموم قارچی به همراه بسترهای مختلف از ضایعات و محصولات جانبی کشاورزی بعنوان جایگزینی برای چرم‌های حیوانی تولید می‌شوند. [۴، ۸، ۲۰، ۲۲] [۶ و ۸]

زیست‌محیطی و اخلاقی زیادی مواجه است، تولید چرم عمدتاً به پرورش حیوانات و پردازش پوست آنان متکی است، [۱۹، ۲۱] پردازش پوست حیوانات یا دباغی که امروزه با کروم و سایر مواد شیمیایی انجام می‌شود. به دلیل سرعت بالا و ارزان بودن مورد توجه است، اما پساب حاصل حاوی مواد سمی شیمیایی در غلظت‌های بالاتر از حد مجاز می‌باشد که خطرات زیست‌محیطی بسیاری را موجب می‌شود. [۱۹-۲۱]

چرم محصول جانبی صنعت گوشت است با توجه به شرایط پیش رو آب و هوایی، تمایل به رژیم‌های غذایی مبتنی بر گیاه و افزایش روز افزون حامیان حیوانات و محیط‌زیست، تحقیق و



شکل ۲ - انواع محصولات مبتنی بر میسلیموم قارچ ها

جدول ۱- بررسی انواع چرم از منابع مختلف

رفرنس	ماده اولیه	فرآیند تولید	معایب	مزایا	خصوصیات	انواع منشاء
[۱۹]	پوست گاو، پوست گوسفندی، پوست شتر مرغ و...	دباغی (کشند، فرآیندهای شیمیایی و فیزیکی)	منشاء جانوری آلودگی محیط‌زیست طی فرآیند تولید گران قیمت بودن	استحکام بالا، بو و رنگ طبیعی، دوام و پایداری بالا، تنوع بالا و زیست‌سازگار بودن	ضخیم، مقاومت کششی و سایشی بالا، نرم، انعطاف‌پذیر، پایدار	جانوری
[۸، ۱۹، ۲۱]	سوخ فسیلی (پلاستیک، پلی‌اورتان، پلی‌وینیل کلرید و سیلیکون)	فرآیندهای پتروشیمی و پلاستیک‌سازی	منشاء سوختی و تجدیدناپذیر آلودگی محیط‌زیستی طی فرآیند تولید زیست‌تخریب‌پذیر نبودن	نسبتاً ارزان بودن قیمت فرآیند تولید نسبتاً آسان	مقاومت متوسط، انعطاف‌پذیر، نرم، پایداری کم	چرم‌های مصنوعی (پلاستیک)

رفرنس	ماده اولیه	فرآیند تولید	معایب	مزایا	خصوصیات	انواع منشاء
[۹، ۱۹، ۲۱-۲۳]	برگ آناناس، فیر تته موز، برگ انگور، کاکتوس، الیاف انبه و...	فرآیندهای شیمیایی، مکانیکی و فیزیکی	استحکام پایین، پایداری کم و عدم توسعه تولید	منشاء گیاهی و تجدیدپذیر سازگار با محیط زیست ارزان قیمت بودن	انعطاف پذیری نسبتا بالا استحکام و پایداری متوسط	گیاهی
[۱، ۴، ۶، ۱۸، ۲۲، ۲۳]	قارچ‌های رشته‌ای و کلاه دار	کشت، فرآیندهای شیمیایی و فیزیکی	توسعه تولید کم	منشاء طبیعی تجدیدپذیر، ارزان بودن، بومی بودن، سازگار با محیط زیست	استحکام و تحمل بالا، نرم و انعطاف پذیر، پایدار	قارچی

جدول ۲- بررسی چرم مبتنی بر میسلیم قارچ‌ها

رفرنس	پرکاربردترین جنس‌های قارچی	مزایا / معایب	چرم مبتنی بر میسلیم	بستر	محیط و روش تهیه پیش کشت برای تلقیح	نوع و شرایط کشت	نوع قارچ
[۱، ۴، ۶، ۲۲، ۲۵]	<i>Ganoderma lucidum</i> <i>Agaricus.spp</i> <i>Fomes</i> <i>Phellinus</i> و <i>Pleutorus</i>	استحکام و تحمل بالا، نیاز به فرآیندهای شیمیایی محدود، ارزان بودن، بومی بودن کاربرد در تولید چرم	ماتریکس میسلیم حصیری، با بوی مطبوع، نرم و انعطاف پذیر	الیاف لیگنوسلولوزی استریل	۱- محیط کشت هاگ‌ها بر روی بستر جامد لیگنوسلولوزی غنی یا محیط کشت جامد ۲- شستشو، جداسازی، آسیاب کردن و تهیه سوسپانسیون قارچی	کشت اغلب در بستر جامد و یا به روش غوطه‌ور	قارچ کلاه‌دار
[۱، ۴، ۶، ۲۲، ۲۵]	<i>Aspergillus.spp</i> <i>Amylomyces rouxii</i>	- نیاز به تیمارهای شیمیایی پس از خشک شدن ماتریکس جهت افزایش انعطاف پذیری و استحکام - بومی بودن و کاربرد در تولید چرم	ماتریکس میسلیم حاصل شکننده	الیاف لیگنوسلولوزی گسسته و استریل	۱- محیط کشت مایع یا جامد مغذیر داشت ۲- فیلتراسیون و برداشت زیست توده شستشو و تهیه سوسپانسیون یا تهیه مستقیم سوسپانسیون قارچی	کشت اغلب در شرایط مایع بسته و نیمه پیوسته	قارچ‌های رشته‌ای

تجارت چرم مبتنی بر میسلیم

صنعت چرم و محصولات چرمی با تجارت سالانه بیش از ۸۰ میلیارد دلار در لیست پر معامله‌ترین محصولات در سراسر جهان قرار دارند. ارزش بازار جهانی کالاهای چرمی ۳۹۴/۱۲ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۰ و نرخ رشد سالانه ۵/۹ درصد است. [۲۰] این آمارها اهمیت این صنعت را در اقتصاد جهانی بیان می‌کنند، از این رو توسعه جایگزین‌های چرمی بر پایه مواد زیستی مورد توجه قرار گرفته است.

در آینده نه چندان دور چرم قارچی یک رقیب سرسخت برای چرم حیوانی و مصنوعی خواهد بود. [۸] شرکت‌ها در حال کار

برای تولید حجم‌های بالاتر از چرم قارچی با هزینه کم‌تر نسبت به سایر چرم‌های مصنوعی هستند. [۴] تولیدکنندگان پیشرو چرم قارچی شرکت‌هایی مانند: MycoWork، Bolt، Mycel، Mycotech Lab، Desserto، Threads، شرکت‌ها با شرکت‌هایی مانند هرمس و مرسدس بنز نیز همکاری می‌کنند. [۸]

مراحل تولید چرم از قارچ

بیشتر گونه‌های قارچ مورد استفاده از نوع قارچ‌های ساپروفیت، رشته‌ای و کلاه‌دار هستند. تخمیر در بسترهای مختلف بر پایه

جمله عوامل تاثیرگذار در انتخاب گونه قارچی تولیدکننده می‌باشد. [۱]

ارتقاء سطح تولید جایگزین چرم قارچی در فرآیند استفاده از سلول‌های زنده به عنوان کارخانه‌های میکروبی، بهینه‌سازی پارامترهای کلیدی برای دستیابی به یک اقتصاد رقابتی در مقیاس مهم است. [۱۸، ۱۹]

بعنوان مثال کشت تک گونه معمولاً گزینه ارجح است اما هیبریداسیون و جهش ممکن است استحکام، انعطاف‌پذیری و دوام محصول را بهبود بخشند. [۸]

از آنجاییکه تنوع فرآیندهای تخریب و تجزیه بستر در قارچ‌ها زیاد است، بسترهای لیگنوسلولوزی توسط تعداد زیادی از گونه‌ها مستعمره می‌شوند اما از این میان، شاخه بازیدیومیست‌ها به دلیل خاصیت چسبندگی طبیعی میسلیموم و توانایی آنها در تجزیه لیگنوسلولوز برای تولید مواد زیستی و هم چنین به دلیل وجود دو ویژگی مهم سپتا^۱ و آناستوموز^۲ در هیف انتخاب شده است. سپتاها دیواره‌های سلولی عرضی قارچ‌ها هستند که دارای یک دریچه باز شونده می‌باشند که می‌توانند بسته شوند و بدین ترتیب به سلول کمک می‌کند تا آسیب وارد شده به کلنی در اثر پارگی را از داخل و خارج کاهش داده و استحکام میسلیموم را بسیار افزایش می‌دهند. در حالی که آناستوموز دارای ویژگی خاصی در ساختن دو هیف مختلف است که در هنگام برخورد با یکدیگر ترکیب می‌شوند و یک شبکه بزرگ امکان حمل و نقل بیشتر مواد مغذی با بستر را فراهم می‌کنند. در نتیجه، میسلیموم می‌تواند سریع، قوی و متراکم رشد کند. این دو ساختار هیف، بازیدیومیست‌ها را در تولید بیومواد منحصربه‌فرد می‌کنند. [۱، ۲]

گانودرما و ترامتس رایج ترین جنس‌های ذکر شده در توضیحات ثبت اختراع هستند و به دنبال آنها فومز، فوزاریوم^۳، پلوروتوس و شیزوفیلوم^۴. به جز فوزاریوم که یک آسکومیست^۵ است، همه گونه‌های ذکر شده در بالا از اعضای بازیدیومیست‌ها هستند. [۲، ۲۲]

گونه‌های قارچی متعلق به راسته آگاریکال‌ها (پلوروتوس استراتوس) منجر به تولید ماتریکس زیستی با مقاومت و

محصولات کشاورزی، تحت‌عنوان مواد لیگنوسلولوزی (سلولز، همی‌سلولز و لیگنین) و به روش‌های متفاوت انجام شده و میسلیموم‌های متراکم حاصل خواهند شد. [۸، ۲۶]

رشد میسلیموم از پیوند هیف‌ها به زیرلایه‌های آلی بستر تشکیل می‌شود، در طول کلونیزاسیون میسلیموم، ترکیب سوبسترا توسط قارچ‌ها از طریق ترشح آنزیم‌هایی مانند لاکتاز، لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز تجزیه می‌شوند به تدریج ساختارهای قوی و سه‌بعدی را تشکیل می‌دهند. [۱، ۵]

پس از برداشت، میسلیموم، تحت یک سری عملیات فیزیکی و شیمیایی با هدف بهبود انعطاف و همچنین افزایش دوام و خواص جذب‌کنندگی قرار می‌گیرد که در زیبایی، شکل، بافت و بهبود شرایط مکانیکی برای کاربردهای مختلف مورد نیاز است. علاوه بر این، تکنیک‌هایی مانند استیل‌زدایی، اتصال عرضی کیتین، دنا توره‌سازی پروتئین و... در تراکم مواد و کنترل رطوبت دخیل می‌باشند. با این حال، فرآیندهای تیماری میسلیموم‌ها هنوز تحت تحقیقات بوده و در حال حاضر هیچ روش یک پارچه و استاندارد بی‌عنوان مبنا اصلی مورد توافق قرارنگرفته است. همچنین باید در نظر داشت که روش‌های پردازش در شرکت‌ها راز تجاری آنها نیز می‌باشد. [۱۹] نوع گونه، نوع بستر و روش‌های ساخت و پردازش نقش زیادی در کیفیت مواد مبتنی بر میسلیموم دارند. با این حال، تأثیر گونه‌های قارچی بر خواص مواد نهایی غالب‌تر از اثر نوع بستر است. [۱، ۵]

انتخاب گونه

انتخاب گونه یکی از چالش برانگیزترین وظایف محققین مختلف در تولید موثر مواد زیستی است. [۱]

هنگامی که یک ماده‌ایی را به عنوان یک ماده مبتنی بر میسلیموم توصیف می‌کنیم، انتظار می‌رود که اکثر ترکیبات این ماده از زیست‌توده قارچی مشتق شده باشد. بنابراین، انتخاب گونه‌های قارچی می‌تواند به طور قابل توجهی بر فرآیند تولید و خواص مواد نهایی حاصله بواسطه ی ویژگی‌های بیولوژیکی آنها تأثیر بگذارد. [۲۲]

تراکم میسلیموم، سرعت رشد، هزینه محیط رشد (سوبسترا)، سطح مضر بودن یا نبودن، سهولت کشت و ساختار میسلیموم از

¹ Septa

² Anastomosis

³ Fusarium

⁴ Schizophyllum

⁵ Ascomycota

نسبت به خاک اره و مخلوط آن نشان می‌دهد. (سرعت رشد قارچ: خاک اره > کاه > باگاس) این امر به دلیل تنوع غذایی و پیچیدگی گلوکان موجود در خاک اره است. علاوه بر این، کاه و باگاس دارای خواص ذرات نرم تری نسبت به خاک اره هستند، بنابراین قارچ‌ها می‌توانند مواد مغذی را به راحتی از بسترهای نرم نسبت به بستر سخت بدست آورند. برای افزایش محتوای غذایی، مکمل‌های مختلف مانند سبوس گندم و سبوس برنج و کاه‌های مختلف کشاورزی می‌توانند با ترکیب بستر رشد قارچ، مخلوط شوند. [۵، ۱]

مراحل فرآیند تولید چرم از قارچ

کشت سویه

به منظور تلقیح در بستر و بررسی سویه، پیش کشتی در محیط غنی و بر اساس نوع قارچ تهیه می‌شود. [۲۰، ۲۱]

آماده سازی بستر

فرآیند آماده‌سازی بستر به نوع قارچ مورد استفاده و نحوه کشت بستگی دارد، فرآیند آماده‌سازی بسترهای لیگنوسلولزی، شامل تنظیم رطوبت بستر، انتقال به ظروف مورد نظر و استریلیزاسیون تحت شرایط استاندارد می‌باشد. [۲۰]

تلقیح در بستر و کشت

کشت قارچ‌ها به سه روش جامد، مایع و غوطه‌ور انجام می‌شوند. [۲۴، ۲۶-۲۸]

تخمیر در حالت جامد: در این نوع تخمیر، قارچ روی بستر جامد رشد می‌کند. تولید بالا، مصرف آب و انرژی کم، آلودگی کم و تولید فاضلاب کم، این روش را به یک روش ترجیحی برای تولید انبوه میسلیم تبدیل کرده‌است. [۲۱، ۲۲، ۲۷، ۲۸]

تخمیر سطحی در حالت مایع: در این نوع تخمیر، در محیط مایع در شرایط استاتیک کشت داده می‌شود. از این حالت تخمیر برای تولید مواد آلی، ترکیبات فرار و میسلیم استفاده می‌شود. [۵، ۲۱، ۲۲، ۲۷، ۲۸]

تخمیر غوطه‌ور: در این نوع تخمیر، کشت قارچ‌ها در محیطی غنی از مواد غذایی انجام می‌شود. همچنین پارامترهای فرآیند در مقیاس بیوراکتور قابل کنترل هستند. میسلیم‌های

استحکام بالاتر می‌شوند. این ویژگی به دلیل توانایی آن در استعمار و رشد سریع بر روی مواد آلی مختلف حاوی لیگنین، سلولز، و همی‌سلولز و دیواره‌های سلولی ضخیم آن‌ها می‌باشد. پلوروتوس استراتوس عضوی از قارچ صدفی است که گاهی اوقات به عنوان "صدف سفید" شناخته می‌شود، می‌تواند منطقه وسیعی لیگنوسلولزها مانند خاک اره یا کاه را مستعمره و تخریب کند. علاوه بر این، پوست خشن و ظاهری سفت آن باعث می‌شود، این گونه در تولید ماتریکس زیستی ارجحیت داشته‌باشد. [۵، ۱]

نوع بستر

عامل مهمی که در افزایش تولید و فرآوری میسلیم برای اهداف تجاری باید در نظر گرفته‌شود، بستر تخمیر است که باید به عنوان یک منبع مقرون‌به‌صرفه انرژی و مواد مغذی برای قارچ عمل کند. افزایش در حجم تولید، مستلزم بهره‌وری و صرفه‌جویی در مقیاس است، بنابراین، مقدار بیشتری از بسترها برای کارخانه ارتقا یافته مورد نیاز است. بسترها ممکن است بطور کامل تخریب شده و یا کامل تخریب نشوند. اصولاً بسترها از یک یا چند منبع کربوهیدرات و نیتروژن و فسفر محلول تشکیل شده‌اند. [۲، ۱۹، ۲۱]

عوامل مهم در انتخاب بستر مناسب: (۱) محتوای غذایی، (۲) در دسترس بودن و فراوانی، (۳) تجزیه‌پذیری، (۴) هزینه کم (۵) خواص بافتی و ساختاری مناسب و (۶) سازگاری. [۱، ۹]

دارابودن مواد مغذی مناسب بستر مانند گلوکز که منبع اصلی مواد مغذی برای قارچ است. برای دریافت این ماده مغذی، برخی از قارچ‌ها سلولز را به گلوکز تجزیه می‌کنند لذا بسترهای با محتوای سلولز بالا به قارچ‌ها اجازه رشد سریع‌تر می‌دهند. [۱، ۵]

از طرفی بستر باید مواد دیگری برای رشد میسلیم مانند کربن، نیتروژن، مواد معدنی، ویتامین‌ها و آب را نیز فراهم کند. بسته به گونه، قارچ‌ها می‌توانند ترکیب سلولز، لیگنین یا همی‌سلولز را تجزیه کنند که هر یک ویژگی خاصی به میسلیم حاصله می‌بخشند. مثلاً میسلیم رشد شده روی سلولز سفت‌تر است، در حالی که افزودن دکستروز به بستر مبتنی بر سلولز، میسلیم تولیدی را الاستیک‌تر می‌کند. [۱، ۵]

سرعت رشد میسلیم در بستر کاه سریعتر از خاک اره است. به طور مشابه، رشد میسلیم روی باگاس سرعت رشد سریع‌تری

حاصل از این روش، حالت اسفنجی و خواص لمسی متفاوتی دارند. [۲۸، ۲۷، ۲۲، ۲۱، ۵]

برداشت میسلیم

برداشت میسلیم با توجه به نوع تخمیر متفاوت است، در تخمیر مایع این مرحله شامل فیلتراسیون و شستشو می‌باشد، در صورتی که در تخمیر جامد میسلیم‌ها با ساختار منسجمی را ایجاد کرده‌اند، برداشت میسلیم همراه با بستر انجام می‌شود. [۲۰، ۲۶]

آماده سازی نمونه

آماده‌سازی نمونه بر اساس نوع قارچ و شرایط تخمیر شامل تیمارهای مختلف فیزیکی، مکانیکی و شیمیایی می‌شود که می‌توان از آنها به پیش تیمار با تانن، گلیسرول و متصل کننده‌های زیستی، برای افزایش انعطاف‌پذیری و بدست آوردن خواص چرم مانند، اشاره کرد. [۲۰، ۲۶] سپس میسلیم‌های تیمار شده تحت فرایندهای فیزیکی و مکانیکی قرار گرفته، پس از فشرده‌سازی و شکل‌گیری در دمای اتاق خشک می‌شوند. [۶، ۲۶]

روش‌های تحلیل نمونه

بررسی خواص فیزیکی، شیمیایی و مکانیکی چرم مبتنی بر میسلیم تهیه شده با استفاده از آزمایشات مختلفی از جمله، تست کشش، تست تراکم، بررسی زاویه تماس آب، طیف سنجی مادون قرمز، میکروسکوپ الکترونی، میکروسکوپ نیروی اتمی، اسکن، بررسی اثرات دما و تولید منسوجات می‌توان اشاره کرد. [۱۸، ۲۶]

یک کیف پول کوچک دوخته شده می‌تواند کارایی محصول را برای منسوجات قارچی با خواص چرمی در مقیاس آزمایشگاهی نشان دهد. [۱۸، ۲۰] همچنین محصول نهایی قابلیت چاپ طرح‌های مختلف و رنگ آمیزی از جمله با استفاده از رنگدانه‌های طبیعی با منشاء قارچی را دارد. [۱۰]

بحث و نتیجه‌گیری

صنعت جهانی چرم همواره با مشکلات مختلف زیست‌محیطی و اخلاقی مواجه بوده چراکه عمدتاً به پرورش حیوانات متکی بوده است. که این امر منتج به جنگل‌زدایی، انتشار گازهای گلخانه‌ای و نگرانی‌هایی پیرامون حیات حیوانات می‌شود. علاوه بر این، دباغی پوست حیوانات، فرآیند تولید چرم طبیعی و همچنین فرآیند تولید چرم مصنوعی (پلاستیکی)، مقدار زیادی مواد شیمیایی سمی تولید می‌کند که در نهایت در محیط منتشر می‌شود. بنابراین، نگرانی فزاینده پیرامون پایداری محیط‌زیست منجر به اکتشاف مواد جایگزین برای چرم‌های مبتنی بر حیوانات شده است. قارچ‌های رشته‌ای و کلاه‌دار بالاخص قارچ‌های رشته‌ای به‌عنوان گروه‌های بسیار غنی و متنوعی از گونه‌ها شناسایی شده‌اند که خود را به عنوان منابع زیستی امیدوارکننده با طیف گسترده‌ای از کاربردهای صنعتی تثبیت کرده‌اند. گونه‌های قارچی مختلف، از جمله گونه‌های آگاریکوس^۱، فومز، گانودرما و پلوروتوس، در حال حاضر بیشترین پتانسیل را در تولید چرم قارچی نشان داده‌اند. رابطه مورفولوژی قارچ و ژنتیک آن در ویژگی‌های میسلیم تولیدی و مبدل شدن آن به ترکیبات با ساختارهای ویژه و استفاده در صنایع مختلف مانند نساجی، خودروسازی، الکترونیک و... بسیار حائز اهمیت است. محصولات مشتق شده از این گروه از ارگانسیم‌ها در حال حاضر راهی به سوی آینده‌ای پایدارتر برای زندگی بر روی کره زمین در نظر گرفته می‌شوند، زیرا آنها دستیابی به محیطی عاری از آلودگی را تسهیل می‌کنند و در عین حال جایگزین‌های تجدیدپذیر را نیز برای منابع مبتنی بر انرژی فسیلی فراهم می‌کنند. یکی از این راه‌حل‌های پایدار، تولید مواد جایگزین چرم از قارچ‌های رشته‌ای از طریق فرآیندهای بی‌خطر برای محیط‌زیست است. در این فرآیند، ضایعات کشاورزی به جایگزین‌های چرم مانند مقرون‌به‌صرفه، سازگار با محیط‌زیست و همه‌کاره تبدیل می‌شوند، بنابراین به طور قابل توجهی به اقتصاد زیستی دایره‌ای کمک می‌کنند که هدف آن افزایش کارایی استفاده از منابع و کاهش انباشت زباله به حداقل ممکن است. اگرچه ارزش پولی این اقتصاد دایره‌ای در حال حاضر قابل اندازه‌گیری نیست، مزایای زیست‌محیطی، از جمله انتشار کمتر و استفاده بهتر از زمین، غیرقابل انکار است. محدودیت‌های شناسایی شده در فناوری جایگزین چرم قارچی را

¹ Agaricus

مواد بسته‌بندی و حتی تولید محصولات جایگزین گوشت کاربرد بالقوه‌ای دارند. با این حال، پتانسیل مواد جایگزین چرم قارچی در بازار مصرف هنوز کم ارزش است زیرا با چالش‌های بی‌شماری مواجه است که از کمبود دانش در زیست‌شناسی قارچی پایه تا چالش‌های صنعتی متغیر است. علاوه بر این، یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های به‌کارگیری این فناوری، ناتوانی جایگزین‌های چرم مشتق‌شده از قارچ و سایر جایگزین‌های چرم در دستیابی به خواص مواد مشابه چرم حیوانات است. انتظار می‌رود که تلاش‌های تحقیق و توسعه بیشتر بر افزایش تطبیق پذیری و دوام این محصولات مشتق‌شده از قارچ متمرکز شود که در نتیجه معرفی مواد میسلیم به طیف وسیع‌تری از مصرف‌کنندگان را تسهیل کند. به چند نمونه از مطالعات انجام شده در جدول ۳ اشاره شده است.

علی‌ایحال، مطالعات حاکی از آنند که باور به آینده‌ای متفاوت پیرامون محصولات مختلف زیستی برای داشتن زندگی پاک‌تر و سبزتر ضروری است و همچنین این مهم راه‌گشایی برای رابطه همزیستی بین طبیعت و محصولات مصرفی خواهد بود.

منابع

- [1] Alemu D, Tafesse M, Mondal AK. Mycelium-based composite: The future sustainable biomaterial. *International journal of biomaterials*. 2022; 2022(1): 8401528.
- [2] Cerimi K, Akkaya KC, Pohl C, Schmidt B, Neubauer P. Fungi as source for new bio-based materials :a patent review. *Fungal biology and biotechnology*. 2019; 10, 1-6.
- [3] Jones M, Mautner A, Luenco S, Bismarck A, John S. Engineered mycelium composite construction materials from fungal biorefineries: A critical review. *Materials & Design*. 2020; 178: 108397.
- [4] Elkhateeb W, GM D. Muskin the amazing potential of mushroom in human life. *Open Access Journal of Mycology & Mycological Sciences*. 2022; 5(1): 1-5.
- [5] Butu A, Rodino S, Miu B, Butu M. Mycelium-based materials for the ecodeign of bioeconomy. *Dig J Nanomater Biostruct*. 2020; 40, 15: 1129.
- [6] Kniep J, Graupner N, Reimer JJ, Müssig J. Mycelium-based biomimetic composite structures as a sustainable leather alternative. *Materials Today Communications*. 2023; 39: 109100.

می‌توان با شیوه‌های طراحی پایدار که به طور خاص برای مواد قارچی طراحی شده است کنار زد و این روش‌ها شامل بهینه‌سازی فرآیند، توسعه مواد کامپوزیتی با سایر مواد زیست‌تخریب‌پذیر، تهیه بستر رشد با کربن کم یا بدون کربن و همچنین انتخاب و بهبود سویه مناسب می‌باشد. در این حوزه مطالعاتی صورت گرفته است، به عنوان مثال در سال ۲۰۲۱ بیست و یک سویه از قارچ‌های پوسیدگی چوب^۱ بر اساس رنگ و قوام میسلیمی انتخاب شدند. در محیط مایع کشت شدند و بعد از بررسی‌های دقیق میکروسکوپی بر روی ساختار، جنس و قوام و میسلیم حاصله، به این نتیجه دست یافتند که از میان سویه‌های مورد بررسی، سویه فومیتوپسیس ایبریکا^۲ مناسب‌ترین سویه جهت توسعه مواد و الیاف چرم مانند است. [۲۹] در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۲۴ از فیساروم پلی سفالوم^۳ یا بلاب (نام یک گونه از رده کپک مخاطی پلاسمودیومی است که در مناطق سایه‌دار، مرطوب مانند برگ‌های پوسیده و کنده درختان زندگی می‌کند.) به منظور توسعه پارچه‌های سازگار با محیط‌زیست، تولید آسان و پایدار استفاده شده است. برای این منظور از آگار، ژلاتین و گلیسرول بعنوان بستر رشد پلاسمودیوم استفاده شده و پس از خشک شدن در هوا، ورقه‌های پارچه‌ای محکم و انعطاف‌پذیری به دست آمده است. در نهایت، ورقه‌های پارچه پلاسمودیوم قابل استفاده در تولید پوشاک و کفش مورد استفاده قرار خواهند گرفت. [۱۸] همچنین در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۴ به منظور تقویت خواص چرم مانند تولیدات مبتنی بر میسلیم قارچ‌های فومز فومنتاریوس^۴، پلوروتوس ارینجی^۵، ترامتس ورسیکالر^۶ و فومیتوپسیس پینیکولا^۷ با استفاده از رویکرد تکنیک کشش بیومیمتیک برای یافتن تقویت‌کننده‌های مناسب جهت افزایش استحکام کششی انجام شده است. [۶]

بر اساس مطالعات انجام شده بر خواص میسلیم قارچ‌ها مشخص شده است که علاوه بر استفاده از قارچ به‌عنوان مواد خام برای جایگزین‌های چرم حیوانات و کاربرد در صنعت نساجی، در تولید الیاف کاربردی در مراقبت زخم، کامپوزیت به‌عنوان عایق و

¹ Wood decay fungi

² *Fomitopsis iberica*

³ *Physarum polycephalum*

⁴ *Fomes fomentarius*

⁵ *Pleurotus eryngii*

⁶ *Trametes versicolor*

⁷ *Fomitopsis pinicola*

جدول ۳- گونه‌های کاربردی قارچ‌ها در تولید چرم و ساختارهای مبتنی بر میسلیم

رفرنس	کاربرد	ماتریکس حاصل	سوبسترا	تخمیر	ساختار	جنس و گونه قارچ	تصویر
[۲۳]، [۲۵]، [۳۰]، [۳۱]	مصنوعات چوبی	-	کیک پوسته‌جو و کلزا	تخمیر جامد	کلاهک سفید مایل به زرد لبه‌دار با سطحی صاف، سمی	<i>Agaricus arvensis</i>	
[۲۲]	تولید کاغذ، مصالح ساختمانی و عایق	ماتریکس میسلیمی فوم‌مانند	کیک پوسته‌جو و کلزا	تخمیر جامد	کلاهک محدب، سفید با سطحی صاف. ساقه دوکی شکل، سفید، قهوه ایی مایل به ارغوانی	<i>Agaricus bisporus</i>	
[۲۵]، [۳۰]، [۳۱]	چرم مبتنی بر میسلیم	میسلیم حاصل نرم، استحکام بالا، دوام بالا و سازگار	محیط کشت حداقل ووگل (نمک ووگل، ساکارز، آب و آگار)	تخمیر مایع - نیمه پیوسته	کلاهک قهوه‌ای مایل به خاکستری، سطح مخملی، مات و موج ساقه استوانه‌ای، باریک، سفید مایل به قهوه‌ای سخت و شکننده	<i>Agrocybe brasiliensis</i>	
[۲۵]، [۳۱]	چرم مبتنی بر میسلیم	میسلیم حاصل نرم، استحکام بالا، دوام بالا و سازگار	محیط کشت حداقل ووگل (نمک ووگل، ساکارز، آب و آگار)	مایع	دارای میسلیم هوایی و بستری قارچ رشته‌ای با کلنی‌های سفید مایل به خاکستری	<i>Amylomyces rouxii</i>	
[۲۵]، [۳۰]، [۳۱]	چرم مبتنی بر میسلیم	میسلیم حاصل نرم، استحکام بالا، دوام بالا و سازگار	محیط کشت حداقل ووگل (نمک ووگل، ساکارز، آب و آگار)	تخمیر جامد	میسلیم‌ها و ریزومورف‌ها هنگام رشد فعال درخشان هستند	<i>Armillaria mellea</i>	
[۳۱]	ورقه‌های ساختاری	میسلیم سفت و محکم دارای الگوی انشعاب خاص در هیف	پوشش‌های گیاهی در حال پوسیدن مانند توده‌های کمپوست و برگ‌های مرده، غلات، آجیل، میوه‌های خشک و...	تخمیر مایع - بسته	هیف‌های داخل میسلیم از نظر بیان ژن، رشد و ترشح بسیار ناهمگن هستند.	<i>Aspergillus nidulans</i>	
[۳۱]	ورقه‌های ساختاری	میسلیم سفت و محکم دارای الگوی انشعاب خاص در هیف	پوشش‌های گیاهی در حال پوسیدن مانند توده‌های کمپوست و برگ‌های مرده، غلات، آجیل، میوه‌های خشک	تخمیر مایع - بسته	هیف‌های داخل میسلیم از نظر بیان ژن، رشد و ترشح بسیار ناهمگن هستند.	<i>Aspergillus niger</i>	
[۳۱]	ورقه‌های ساختاری	میسلیم سفت و محکم دارای الگوی انشعاب خاص در هیف	پوشش‌های گیاهی در حال پوسیدن مانند توده‌های کمپوست و برگ‌های مرده، غلات، آجیل، میوه‌های خشک	تخمیر مایع - بسته	هیف‌های داخل میسلیم از نظر بیان ژن، رشد و ترشح بسیار ناهمگن هستند.	<i>Aspergillus oryzae</i>	

تصویر	جنس و گونه قارچ	ساختار	تخمیر	سوبسترا	ماتریکس حاصل	کاربرد	رفرنس
	<i>Calocybe gambosa</i>	مستحکم، سفید مایل به کرم، فیبریل های کوچک، فشرده و سخت، قارچ سمی	تخمیر جامد	خاک غنی از سنگ آهک	ماتریکس میسلیم فشرده مستحکم و سخت	مصنوعات چوبی	[۲۲]
	<i>Calvatia gigantea</i>	غول پیکر با کلاهک کروی و نامتقارن سفید مایل زرد و ساقه بسیار کوتاه	تخمیر جامد	برگ درختان	ماتریکس چرم مانند همانند پوسته رویی قارچ	چرم مبتنی بر قارچ	[۲۲] [۳۰]
	<i>Cerioporus squamosus</i>	منفرد تا گروهی، مسطح و دایره ای، کرم تا زرد کمرنگ، دارای منافذ	تخمیر جامد	لیگنوسلولوزی	ظاهر ماتریکس چرم مانند	چرم مبتنی بر قارچ	[۳۲]
	<i>Ceriporia lacerata</i>	ماکرو قارچ مسطح فاقد ساقه کلنی سفید تا اخراپی	تخمیر مایع - بسته	محیط کشت حداقل ووگل (نمک و ووگل، ساکارز، آب و آگار) آگار سیب زمینی	میسلیم حاصل نرم، استحکام بالا، دوام بالا و سازگار	چرم مبتنی بر میسلیم	[۲۵] [۳۱]
	<i>Coprinus comatus</i>	کلاهک با فلس های قهوه ای کمرنگ، ساقه سفید ضخیم و بلند.	تخمیر مایع - بسته	محیط کشت حداقل ووگل (نمک و ووگل، ساکارز، آب و آگار)	میسلیم حاصل نرم، استحکام بالا، دوام بالا و سازگار	چرم مبتنی بر میسلیم	[۲۵] [۳۱]
	<i>Cordyceps militaris</i>	بدنه ای استوانه ای، کرم مایل به نارنجی رنگ، هیف های بی رنگ و منفذدار	تخمیر جامد	اتصال به اسکلت بیرونی بدن حشرات (کیتین)	ماتریکس مطابق با چرم حیوانی	منسوجات چرمی بر پایه چرم	[۲۲]
	<i>Disciotis venosa</i>	ظاهر فنجان شکل، سطح داخلی فنجان قهوه ای و سطح بیرونی سفید میباید بسیار شکننده و دارای ساقه کوتاه	تخمیر جامد	خاکهای مناطق درختان سوزنی	ماتریکس میسلیمی با قابلیت پردازش جهت استفاده در کاربردهای متفاوت	منسوجات مبتنی بر قارچ	[۲۲]
	<i>Fibroporia vaillantii</i>	ظاهر کپک مانند	تخمیر جامد	محیط کشت حداقل ووگل (نمک و ووگل، ساکارز، آب و آگار) سلولز و همی سلولز و چوب درختان مخروطی مانند کاج	ماتریکس سخت و مستحکم	در ساخت سازه های چوبی و ساختمانی	[۱۷] [۲۵] [۳۱]

تصویر	جنس و گونه قارچ	ساختار	تخمیر	سویسترا	ماتریکس حاصل	کاربرد	رفرنس
	<i>Fistulina hepatica</i>	شبه یک زبان بزرگ و بصورت صفحه ای است و سطح آن خشن با رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز است. (با افزایش سن قارچ رنگ آن قرمز تیره می‌شود)	تخمیر جامد	محیط کشت حداقل ووگل (نمک ووگل، ساکارز، آب و آگار)	میسلیم حاصل نرم، استحکام بالا، دوام بالا و سازگار	چرم مبتنی بر میسلیم	[۲۵]، [۳۱]
	<i>Flammulina velutipes</i>	کلاهک کمی برآمده، صورتی مایل به قهوه‌ای سطحی صاف، دارای ساقه بلند و بصورت گروهی	مایع - نیمه پیوسته	محیط کشت حداقل ووگل (نمک ووگل، ساکارز، آب و آگار)	میسلیم حاصل نرم، استحکام بالا، دوام بالا و سازگار	چرم مبتنی بر میسلیم	[۲۵]، [۳۱]
	<i>Fomes fomentarius</i>	شبه سم اسب، دارای برآمدگی‌های گسترده و متحدالمرکز با حاشیه ای صاف و گرد بدنه سفت و فیبری و به رنگ قهوه ای دارچینی است. سطح بالایی سخت و چوبی است. قسمت زیرین دارای منافذ به رنگ قهوه ای است.	تخمیر جامد	لیگنین	میسلیم حصیری، قهوه ای، مخملی، ضخیم، بوی مطبوع و ساختار تشک مانند	ورقه‌های مبتنی بر میسلیم قارچی	[۲۲]، [۲۳]، [۲۵]
	<i>Fomitopsis officinalis</i>	ظاهر مخروطی مشخص با بیش از ۵۰ سانتی متر.	تخمیر جامد	محیط کشت حداقل ووگل (نمک ووگل، ساکارز، آب و آگار).	میسلیم حاصل نرم، استحکام بالا، دوام بالا و سازگار	چرم مبتنی بر میسلیم	[۱۴]، [۲۵]، [۳۱]
	<i>Ganoderma applanatum</i>	زرد مایل به سفید، فشرده و رشد سریع برچه پنبه ای	تخمیر جامد	سلولز ساقه پنبه کاه شلتوک، پودر شلتوک ریز و گرد و غبار اره	میسلیم با رنگ طبیعی توام شده با سویسترای بستر دارای تحمل دمایی بالا، بوی مطبوع و مستحکم	منسوجات و ورقه‌های مبتنی بر میسلیم قارچی	[۳۲]
	<i>Ganoderma lucidum</i>	سفیدترین قهوه ای، فشرده و بسیار متراکم با لکه‌های قهوه ای در وسط برچه پنبه ای	تخمیر جامد	سلولز ساقه پنبه	میسلیم حصیری تشک مانند با رنگ زرد مایل به نارنجی	منسوجات و ورقه‌های مبتنی بر میسلیم قارچی	[۸، ۱]، [۱۱]، [۲۲]، [۳۲]
	<i>Ganoderma oregonense</i>	برچه پنبه ای	تخمیر جامد	سلولز ساقه پنبه کاه شلتوک، پودر شلتوک ریز و گرد و غبار اره	میسلیم با چگالی کم، استحکام کششی بالا	چرم و ظروف بسته بندی مبتنی بر میسلیم قارچی	[۱]، [۲۳]، [۲۵]، [۳۲]

تصویر	جنس و گونه قارچ	ساختار	تخمیر	سوبسترا	ماتریکس حاصل	کاربرد	رفرنس
	<i>Ganoderma resinaceum</i>	برچه پنبه ایی	تخمیر جامد	سلولز ساقه پنبه کاه شلتوک، پودر شلتوک ریز و گرد و غبار اره	میسلیوم حاصل نرم، استحکام بالا، چگالی کم، دوام بالا و سازگار	چرم و ظروف بسته بندی مبتنی بر میسلیوم قارچی	[۱] ،۲۳ ،۲۵ [۳۲]
	<i>Ganoderma sessile</i>	برچه پنبه ایی	تخمیر جامد	کاه شلتوک، پودر شلتوک ریز و گرد و غبار اره	میسلیوم حاصل نرم، استحکام بالا، چگالی کم، دوام بالا و سازگار	چرم و ظروف بسته بندی مبتنی بر میسلیوم قارچی	[۱] ،۲۳ ،۲۵ ،۲۴ [۳۱]
	<i>Ganoderma tsugae</i>	برچه پنبه ایی	تخمیر جامد	سلولز ساقه پنبه کاه شلتوک، پودر شلتوک ریز و گرد و غبار اره	میسلیوم با چگالی کم، استحکام کششی بالا	چرم و ظروف بسته بندی مبتنی بر میسلیوم قارچی	[۱] ،۲۳ ،۲۵ ،۳۱ [۳۲]
	<i>Hericium erinaceus</i>	توبرکل های پیازی بزرگ و نامنظم با قطر ۵ تا ۴۰ سانتی متر، دارای خارهای شلوغ، آویزان و تولید کننده هاگ سیستم هیف مونومیت، آمیلونید و متشکل از هیف های دیواره نازک تا ضخیم با حدود ۳-۱۵ میکرومتر (میکرون) عرض.	مایع - بسته	محیط کشت حداقل ووگل (نمک) ووگل، ساکارز، آب و آگار) لیگنین (انگل درختی)	میسلیومی حاصل نرم، استحکام بالا، دوام بالا و سازگار	چرم مبتنی بر میسلیوم	[۲۲] ،۲۵ [۳۱]
	<i>Trametes versicolor</i>	زرد مایل به سفید و متراکم	تخمیر جامد	گرد و غبار اره ترشه های چوب، هویج کنفی و الیاف، و حصیر کنفی.	میسلیوم با چگالی کم، استحکام کششی بالا	چرم و ظروف بسته بندی مبتنی بر میسلیوم قارچی	[۸،۹] ،۱۵ [۲۵]

[7] da Silva Junior CJG, de Amorim JDP, de Medeiros ADLM, de Holanda Cavalcanti AKL, do Nascimento HA, Henrique MA, et al. Design of a Naturally Dyed and Waterproof Biotechnological Leather from Reconstituted Cellulose. *Journal of Functional Biomaterials*. 2022; 13(2): 49.

[8] Raman J, Kim D-S, Kim H-S, Oh D-S, Shin H-J. Mycofabrication of mycelium-based leather from brown-rot fungi. *Journal of Fungi*. 2011; 8(3): 317.

[9] Akhter S, Jahan MS, Rahman ML, Ruhane TA, Ahmed M, Khan MA. Revolutionizing Sustainable Fashion: Jute–Mycelium Vegan Leather Reinforced with Polyhydroxyalkanoate Biopolymer Crosslinking from Novel Bacteria. *Advances in Polymer Technology*. 2024; 2024(1): 1304800.

[۱۰] بیرانوند، شیدا، پورل، نوروزی. بهینه سازی تولید بتاکاروتن رودوتورلا موسیلوژینوسا جدا شده از پساب کارخانه چرم.

فصلنامه علمی پژوهشی دنیای میکروبیها. ۲۰۱۹; ۱۲ (شماره ۱ (پیاپی ۳۸): ۳۹-۵۲.

- [11] Larypoor M. Investigation of HER-3 gene expression under the influence of carbohydrate biopolymers extract of shiitake and reishi in MCF- γ cell line. *Molecular biology reports*. 2022; 49(7): 72-6563.
- [12]
- [13] Elkhateeb W, Daba G. Marine endophytes a natural novel source for a treasure of bioactive compounds. *J Adv Microbiol Res*. 2022; 5(018): 2.
- [14] Larypoor M, Gharakhani F. A review of the antimicrobial effects of metabolites extracted from cap fungi. 2022.
- [15] Elkhateeb WA, Daba GM, Elnahas MO, Thomas PW. Fomitopsis officinalis mushroom: ancient gold mine of functional components and biological activities for modern medicine. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 2019; 18(4): 9-285.
- [16] Yasrebi N, Zarmi AH, Larypoor M, Zeynali M, Ebrahimi-Hosseinzadeh B, Mokhtari-Hosseini ZB, et al. In vivo and in vitro evaluation of the wound healing properties of chitosan extracted from *Trametes versicolor*. *Journal of Polymer Research*. 2021; 11, 1-28.
- [17] Madusanka C, Udayanga D, Nilmini R, Rajapaksha S, Hewawasam C, Manamgoda D, et al. A review of recent advances in fungal mycelium based composites. *Discover Materials*. 2024; 4(1): 13.
- [18] Isola D, Lee H-J, Chung Y-J, Zucconi L, Pelosi C. Once upon a Time, There Was a Piece of Wood: Present Knowledge and Future Perspectives in Fungal Deterioration of Wooden Cultural Heritage in Terrestrial Ecosystems and Diagnostic Tools. *Journal of Fungi*. 2024; 10(5): 366.
- [19] Bi Z, Crnković T. Bio-leather: Sustainable clothing fabrics made from simple media ingredients and slime mold *Physarum polycephalum*. *Journal of Industrial Textiles*. 2024; 54: 15280837241254210.
- [20] Elkhateeb WA, Galappaththi M, Wariss H, Haesendonck K, Daba GM. Fungi-derived leather (mushroom leather). *Mycoking*. 2022; 5, 1.
- [21] Wijayarathna EKB, Mohammadkhani G, Soufiani AM, Adolffson KH, Ferreira JA, Hakkarainen M, et al. Fungal textile alternatives from bread waste with leather-like properties. *Resources, Conservation and Recycling*. 2022; 179: 106041.
- [22] Amobonye A, Lalung J, Awasthi MK, Pillai S. Fungal mycelium as leather alternative: A sustainable biogenic material for the fashion industry. *Sustainable Materials and Technologies*. 2023: e00754.
- [23] Elsacker E, Vandelook S, Peeters E. Recent technological innovations in mycelium materials as leather substitutes: a patent review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023; 11.
- [24] Jones M, Gandia A, John S, Bismarck A. Leather-like material biofabrication using fungi. *Nature Sustainability*. 2021; 4(1): 9-16.
- [25] Conceição AA, Mendes TD, Mendonça S, Quirino BF, Almeida EGd, Siqueira FGD. Nutraceutical enrichment of animal feed by filamentous fungi fermentation. *Fermentation*. 2022; 8(8): 402.
- [26] Smith MJ, Kittleson JT, Eng DJ, Boulet-Audet M. Mycelium materials, and methods for production thereof. *Google Patents*; 2023.
- [27] Razzaq MA, Lyzu C, Parveen S, Uddin MT, Shaikh MAA, Chowdhury MJ, et al. Fatliquor for fungus resistant leather-a sustainable ecofriendly approach. *Heliyon*. 2024.
- [28] Pechini MP. Washington, DC: US patent and trademark office. US patent. 1967; 3: 697.
- [29] Greetham L, McIntyre GR, Bayer E, Winiski J, Araldi S. Mycological biopolymers grown in void space tooling. *Google Patents*; 2022.
- [30] Cartabia M, Girometta CE, Milanese C, Baiguera RM, Buratti S, Branciforti DS, et al. Collection and characterization of wood decay fungal strains for developing pure mycelium mats. *Journal of Fungi*. 2021; 7(12): 1008.
- [31] Polemis E, Zervakis G, Gargano M, Denchev C, Denchev T, Venturella G. Selected Choice Wild Edible Mushrooms.
- [32] Case DA, Aktulga HM, Belfon K, Ben-Shalom I, Brozell SR, Cerutti DS, et al. *Amber* 2021: University of California, San Francisco; 2021.
- [33] Ross P, Wenner N, Moorleggen C. Method of producing fungal materials and objects made therefrom. *Google Patents*; 2020.



مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات سطح اسفنگوزین و سرامیدها در نمونه‌های الیگوزواسپرمی از مردان نابارور

آتنا اکبری، فاطمه قاسمیان*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): Ghasemian@guilan.ac.ir

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۳

چکیده

مقدمه: الیگوزواسپرمی یکی از دلایل ناباروری در مردان است که براساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت، با تعداد کم اسپرم در مقایسه با حالت نرموزواسپرمی همراه است. از طرفی اسفنگولیپیدها تنظیم کننده‌های مهم بسیاری از فرایندهای سلولی مانند تمایز و آپوپتوز سلول هستند. از مهمترین متابولیت‌های اسفنگولیپیدی می‌توان به سرامیدها و اسفنگوزین اشاره کرد که از بین رفتن حالت پایدار در میزان سرامید می‌تواند منجر به آپوپتوز شود. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات انواع مختلف سرامید و اسفنگوزین در نمونه‌های الیگوزواسپرمی از مردان نابارور است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه نمونه سیمین از زوج‌های مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری الزهرا، رشت جمع‌آوری شدند (n=10). نمونه‌ها براساس پارامترهای سازمان جهانی بهداشت آنالیز شدند و گروه‌های الیگوزواسپرمی (اسپرم کمتر از 15 میلیون در هر میلی لیتر سیمین) و نرموزواسپرمی وارد مطالعه شدند. مقدار انواع سرامیدها (Cer14, Cer16, Cer18) و Cer (20) و اسفنگوزین با استفاده از روش کروماتگرافی مایع با کارایی بالا اندازه گیری شد.

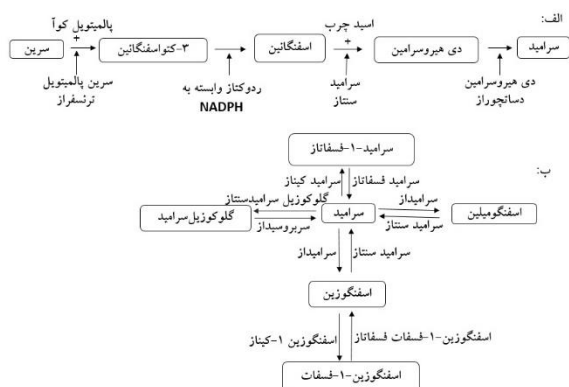
نتایج: یافته‌ها نشان داد که تفاوت معنی داری در مقدار اسفنگوزین در گروه الیگوزواسپرمی در مقایسه با نرموزواسپرمی وجود دارد (p<0/05). همچنین مقدار انواع سرامیدها در گروه الیگوزواسپرمی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش داشت (p<0/0001).

بحث و نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج نشان می‌دهد که متابولیت‌های اسفنگولیپیدی نقش بسیار مهمی در کمیت اسپرماتوژنز ایفا می‌کند و تغییرات در آن می‌تواند منجر به کاهش باروری در مردان شود. از این متابولیت‌ها می‌تواند معیار خوبی برای ارزیابی‌های باروری و همچنین اهداف دارویی قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: اسپرم، ناباروری مردان، سرامید، اسفنگوزین.

مقدمه

ضروری است [۵]. اسفنگولیپیدها از اسفنگوئید تشکیل می‌شوند و این لیپیدها و مشتقات آن عملکردهای متفاوتی در سلول دارند [۶]. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌کنید اسفنگوزین متابولیتی است که می‌تواند به سرامید یا اسفنگوزین ۱-فسفات تبدیل شود. چنانچه تعادل در میزان تولید این دو متابولیت به هم ریزد به ترتیب منجر به شروع فرایندهای آپوپتوز یا رشد سلول خواهند شد [۳]. از طرف دیگر، بیوسنتز از نو اسفنگولیپیدهای طبیعی، همانند کاتابولیسم، چندین متابولیت تولید می‌کنند که مهمترین آنها سرامید است [۱]. بنابراین سطوح حالت پایدار سرامید در سلول‌ها ممکن است به وسیله مجموعه ای از آنزیم‌ها تولید شود که این آنزیم‌ها در جایگاه‌های مختلفی سنتز و پردازش می‌شوند.



شکل ۱. بخشی از مسیر متابولیسم اسفنگولیپیدها. سرامید می‌تواند سرنوشت متفاوتی داشته باشد. برهم خوردن تعادل در تولید و مصرف سرامید، منجر به شروع آپوپتوز می‌شود.

در بیضه پستانداران بالغ بارور، سلول‌های گرد اسپرماتوگونی در داخل لوله‌های منی‌ساز وجود دارد. این‌ها سلول‌های زایای اسپرماتوگونی هستند که در نهایت اسپرم‌های بالغ هاپلوئید را به وجود می‌آورند که تحت حمایت متابولیکی و ساختاری سلول‌های سرتولی هستند. در جریان اسپرماتوژنز نرمال، تعدادی از سلول‌های زایای در حال بلوغ دچار آپوپتوز می‌شوند [۴] و الیگوزواسپرمی را به وجود می‌آورد. Tilly و Kolesnick پیشنهاد کردند که سرامیدهای مشتق شده از اسفنگومیلین و اسفنگومیلین ۱- فسفات می‌توانند اثرات بالقوه‌ای بر فیزیولوژی گناد از طریق میانجی‌گری آپوپتوز و کنترلش در شرایط طبیعی و پاتولوژی داشته باشند، که با بررسی و اندازه‌گیری این متابولیت‌ها

ناباروری یک مشکل تولیدمثلی رایج است و ناباروری مردانه حدود نیمی از دلایل آن را تشکیل می‌دهد [۱]. جمعیت معنی داری از موارد ناباروری مردانه با کیفیت غیرطبیعی سیمن همراه هستند که می‌توان به آستنوزواسپرمی، تراتوزواسپرمی، الیگوزواسپرمی و آزواسپرمی اشاره کرد [۱]. با این وجود الیگوزواسپرمی با تعداد کم اسپرم همراه است که منجر به ناباروری مردانه می‌شود. براساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization: WHO) نمونه‌های الیگوزواسپرمی دارای اسپرم‌هایی با مورفولوژی طبیعی (بیشتر از ۴ درصد) و تحرک طبیعی (بیشتر از ۳۹ درصد) هستند، اما تعداد اسپرم‌ها کمتر از ۱۵ میلیون در هر میلی لیتر منی است و به عنوان الیگوزواسپرمی شناخته می‌شوند [۲].

عمده‌ترین اسفنگولیپیدهای سلول‌های یوکاریوت، اسفنگولیپیدها و اسفنگوفسفولیپید اسفنگومیلین هستند که نقش تاثیرگذاری در ساختمان و عملکرد غشای سلول دارند. به دلیل این که متابولیت‌هایشان مانند سرامیدها، بازهای اسفنگوئید و بازهای اسفنگوئید فسفریله شده به عنوان مهمترین پیام‌رسان‌های سیگنالینگ سلولی هستند، اینها به یکی از جذاب‌ترین موضوعات در چند دهه گذشته تبدیل شده‌اند [۳]. سرامیدها (Ceramide: Cer) یا N-اسیل اسفنگوزین، ساختار پایه ای و اساسی اسفنگولیپیدها هستند. در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که سرامیدها در فرایندهایی مانند تمایز سلولی، استرس، سرکوب رشد، پیری و آپوپتوز درگیر هستند [۴]. اسفنگومیلین و سرامیدها عملکردهای بسیار متفاوتی را در جایگاه‌های مشخصی از سلول دارند، چونکه تغییرات در نسبت مولی شان منجر به تغییرات در خصوصیات فیزیکی غشا می‌شود و بنابراین منجر به تشکیل میکرو دومین‌هایی می‌شود که وزیکوله شدن غشا، چسبندگی غشا، عبور و مرور وزیکول‌های و سایر جنبه‌های دینامیکی غشا را کنترل می‌کند [۴]. بنابراین اسفنگومیلین و سرامید لیپیدهایی با چندین عملکرد هستند، به طوریکه سرامید عمدتاً در این عملکردها درگیر هستند که ممکن است به صورت از نو (de novo) یا به وسیله اسفنگومیلینازهای خاصی سنتز شوند. مسیر متابولیک اسفنگولیپید سیستم پیچیده ای است که برای بقای سلول و پاسخ به سیگنال‌های استرس

معیارهای سازمان جهانی بهداشت (WHO, 2010) ارزیابی شدند. این معیارها عبارتند از ارزیابی حجم سیمن، pH، ویسکوزیته، غلظت اسپرم، تعداد کل اسپرم، مورفولوژی اسپرم، تحرک و وجود عفونت. بنابراین براساس ارزیابی‌ها، نمونه‌های سیمن به گروه‌های مختلف نرموزواسپرمی (غلظت اسپرم بالاتر از ۱۵ میلیون در هر میلی لیتر سیمن، مورفولوژی طبیعی بالاتر از ۴ درصد و تحرک بالاتر از ۳۲ درصد) و الیگوزواسپرمی (غلظت اسپرم کمتر از ۱۵ میلیون در هر میلی لیتر سیمن) تقسیم شدند [۲].

استخراج و آنالیز اسفنگوزین با استفاده از HPLC

لیپیدها با ۲ میلی لیتر کلروفرم/متانول (۱:۱، v/v) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق استخراج شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شدند. ۱ میلی لیتر کلروفرم و ۰/۷۵ میلی لیتر از ۰.۷۳% NaCl به آن اضافه شد تا جداسازی فاز انجام شود و لایه پایینی کلروفرم جدا شد. فاز بالایی یک بار با ۱ میلی لیتر کلروفرم شسته شد و لایه‌های کلروفرم ترکیب شده به طور کامل تا حالت رسوب خشک تبخیر شدند. برای حل کردن مجدد، از ۰/۵ میلی لیتر NaOH ۰/۱ مولار آماده شده در متانول استفاده شد. لیپیدها برای ۳۰ دقیقه با افزودن ۲۵ میکرولیتر معرف O-فتالدهید (OPA) [۵ میلی گرم OPA، ۰/۱ میلی لیتر اتانول، ۵ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول، و ۱۰ میلی لیتر اسید بوریک ۳% (وزنی/حجمی) با pH تنظیم شده به ۹] مشتق‌سازی شدند.

بازهای اسفینگوئیدی و لیزوگلیکوسفینگولیپیدها را با استفاده از سیستم HPLC جدا کردیم. فاز متحرک متانول/آب به نسبت ۱۲:۸۸ (vol/vol) بود. ما ترکیبات لیزو مشتق‌شده با OPA را با دتکتور فلورسانس در طول موج تحریک ۳۴۰ نانومتر و طول موج نشر ۴۳۵ نانومتر کمی‌سازی کردیم. شناسایی پیک بر اساس مقایسه زمان‌های بازداری انجام شد [۸ و ۹] و مقدار اسفنگوزین اندازه‌گیری شد.

استخراج و آنالیز سرامید با استفاده از HPLC

نمونه‌ها دو بار با بافر فسفات سالیین (PBS) سرد شستشو داده شدند. نمونه‌ها فریز و ذوب شدند و سپس رسوب حاصل در آب

در برش‌های لوله‌های منی‌ساز انسان نیز تایید شده است [۷]. تعادل بین تحریک و توقف رشد سلول در بیضه بالغ، یک تعادل ظریف بین بیوسنتز، بازسازی، کاتابولیسم و بازیافت لیپیدها (مانند اسفنگولیپیدها) را درگیر می‌کند. با این اوصاف هنوز نوع و میزان سرامید و اسفنگوزین در نمونه‌های سیمن افراد نابارور با جزئیات مشخص نشده است.

با توجه به بررسی‌های انجام شده، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تغییرات متابولیت‌های اسفنگولیپیدی در نمونه‌های سیمن از مردان نابارور انجام نشده است. از طرف دیگر، با توجه به اینکه ارتباط محکمی بین سرامید و فرایند آپوتوز وجود دارد، این پس زمینه از فرایند آپوتوز منجر به ایجاد یک هدف جهت بررسی تجربی در این مطالعه شد. به طوریکه هدف از این مطالعه اندازه‌گیری میزان انواع سرامیدها (C14, C16, C18, C20) و اسفنگوزین در نمونه‌های سیمن الیگوزواسپرمی و مقایسه آن با افراد نرموزواسپرمی است.

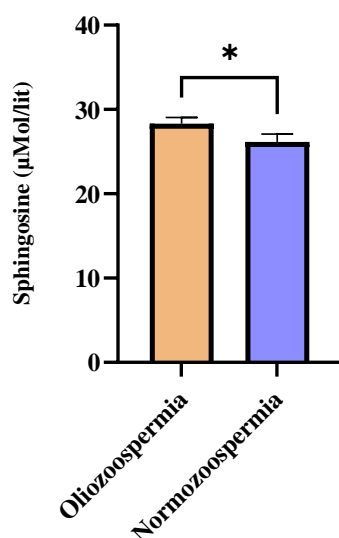
مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه سیمن از زوج‌های مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری (IVF) جمع‌آوری شدند (n=۱۰). این افراد از میان زوج‌هایی که به مرکز درمان ناباروری بیمارستان الزهرا (گیلان، رشت) در طی سال‌های ۱۴۰۲ تا ۱۴۰۳ جهت درمان ناباروری مراجعه کرده بودند و تحت درمان کمک باروری قرار گرفتند، انتخاب شدند و رضایت کامل از این زوج‌ها بدست آمد. لازم به ذکر است که این مطالعه فقط بر زوج‌های نابارور با ناباروری فاکتور مردانه الیگوزواسپرمی صورت گرفت و برخی از نمونه‌ها به دلیل مصرف داروهای هورمونی توسط مردان و یا وجود بیماری دیابت و/یا بیماری‌های تیروئیدی در مردان و سایر فاکتورهای ناباروری مردانه از مطالعه خارج شدند. میانگین سن مردان 30.8 ± 5 سال است و هیچگونه تفاوت آماری در سن و ایندکس جرم بدن (Body Mass Index: BMI) این افراد وجود ندارد.

نمونه سیمن به روش انزال در یک ظرف استریل جمع‌آوری و در اختیار آزمایشگاه قرار گرفت (در همان روز برداشت تخمک). نمونه‌ها برای مدت ۶۰-۱۵ دقیقه بعد از انزال در دمای اتاق به حالت مایع و روان درآمدند و پارامترهای سیمن مطابق با

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، میزان اسفنگوزین در نمونه‌های الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی (گروه کنترل) به ترتیب ۲۶/۱۴ و ۲۸/۳ میکرومول/لیتر است. آنالیز آماری اختلاف معنی داری را بین دو گروه نشان می‌دهد ($P=0.371$).



شکل ۲. میزان اسفنگوزین در نمونه‌های الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی. نتایج تفاوت معنی داری را در میزان اسفنگوزین بین دو گروه نشان می‌دهد.

* $P < 0.05$

میزان سرامیدها در نمونه‌های الیگوزواسپرمی

نتایج نشان می‌دهد (شکل ۳)، میزان Cer14 در گروه الیگوزواسپرمی در مقایسه با گروه کنترل (نرموزواسپرمی) افزایش معنی داری دارد (به ترتیب $0.14 \mu\text{Mol/lit}$ و $0.02 \mu\text{Mol/lit}$; $P < 0.0001$) (شکل ۳a). مقدار Cer16 نیز در گروه الیگوزواسپرمی در مقایسه با گروه نرموزواسپرمی تفاوت معنی داری را نشان می‌دهد (به ترتیب $0.25 \mu\text{Mol/lit}$ و $0.02 \mu\text{Mol/lit}$; $P < 0.0001$) (شکل ۳b). ادامه آنالیز آماری، افزایش معنی داری را در مقدار Cer18 در گروه الیگوزواسپرمی ($0.31 \mu\text{Mol/lit}$) در مقایسه با نرموزواسپرمی ($0.04 \mu\text{Mol/lit}$) نشان می‌دهد ($P < 0.0001$) (شکل ۳c). اندازه‌گیری مقدار Cer20 در نمونه‌های الیگوزواسپرمی ($0.12 \mu\text{Mol/lit}$) هم تفاوت معنی داری را نسبت به گروه کنترل ($0.01 \mu\text{Mol/lit}$) نشان داد ($P < 0.0001$) (شکل ۳d).

مقطر به وسیله سونیکاسیون همگن شدند. نمونه‌ها در 800 g سانتریفیوژ شدند. لیبیداها با استفاده از روش تقسیم بندی Folch با مخلوطی از کلروفرم-متانول (۲:۱، v/v) استخراج شدند. سپس در 1500 g سانتریفیوژ شده و در نهایت با کلروفرم-متانول -آب (۴۷:۴۸:۴۷۳:۳، v/v/v) شستشو داده شدند. فاز آلی تحت یک جریان ملایم نیتروژن خشک تبخیر شدند. نمونه‌ها مجدداً با 200 میلی لیتر از ترکیب اتانول-فرمیک اسید (۹۹/۸ : ۰/۲) ورتکس شدند تا کاملاً حل شود.

کروماتوگراف مایع با کارایی بالا high-performance liquid chromatograph: (HPLC) Unicam- یک دستگاه سری ۲۰۰ است که مجهز به یک پمپ باینری، یک دگازور خلا، یک محفظه ستونی با دماکنترل و یک اتوسمپلر است. جداسازی‌های HPLC در دمای 70 درجه سانتی‌گراد بر روی ستون Nucleosil AB انجام شد. فاز متحرک یک مخلوط گرادیان بود که به صورت زیر تشکیل شده بود: (A) آب - استونیتریل - ۲- پروپانول (v/v/v، ۱:۱:۸) و (B) استونیتریل - ۲- پروپانول (v/v، ۱:۹). مراحل برنامه گرادیان به شرح زیر بودند: صفر دقیقه $35:65$ (A-B)، ۲ دقیقه $35:65$ (A-B)، ۷ دقیقه $10:90$ (A-B)، ۱۳ دقیقه $10:90$ (A-B)، ۱۵ دقیقه $10:90$ (A-B)، ۱۶ دقیقه $35:65$ (A-B)، ۱۸ دقیقه $35:65$ (A-B). فاز متحرک قبل از استفاده به مدت 10 دقیقه در حمام اولتراسونیک دگاز شد. نرخ جریان 0.450 میلی‌لیتر در دقیقه بود. حجم نمونه تزریقی 6 میکرولیتر بود. محلول‌های استاندارد با حل کردن سرامید در مخلوطی از اتانول-اسید فرمیک (V/V)، $99/8 : 0/2$) تهیه شدند [۱۰] و مقدار انواع سرامیدهای C14، C16، C18 و C20 اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

جهت انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار Graphpad prism 9 و برای بررسی معنی دار بودن تفاوت مقادیر از تست t-student استفاده شد. داده‌های همه‌ی گروه‌ها در سطح اطمینان ۹۵% ($P < 0.05$) برای تعیین اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

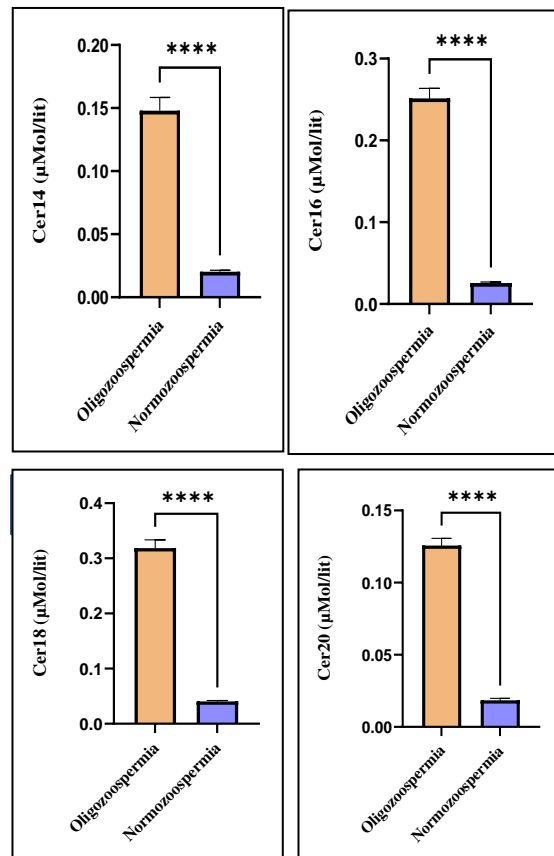
میزان اسفنگوزین در نمونه‌های الیگوزواسپرمی

اسفنگومیلین است و اینها در مکانیسم‌های آپوپتوز درگیر نیستند [۱۲].

در حال حاضر بسیار سخت است که نتیجه‌گیری قطعی در ارتباط با نقش بیولوژیکی سرامیدهای ساده مانند سرامیدهای ۱۶ یا ۱۸ یا ۲۴ در موقعیت‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی در بدن گرفته شود. با توجه به پیچیدگی‌های متابولیک، بیولوژی سلول و مسیرهای سیگنالینگ عمل کننده در سطوح مختلف‌شان در سلول، ارزیابی‌ها همچنان ادامه دارد. مقدار کلی سرامید در بیضه بیان کننده تعادل بین فرایندهای تولید و حذف سرامید است و منجر به ایجاد یک حالت پایدار از آنها در بیضه بالغ می‌شود. به نظر می‌رسد که هدف مهم این گونه‌های اسفنگولیپیدی ایجاد شده در بیضه‌ها این است که به تدریج و در نهایت به اجزای این گامت‌ها تبدیل شوند.

اسفنگولیپیدها به طور گسترده در غشای سلول بیان می‌شود و در تمایز، رشد و سیگنالینگ غشایی درگیر هستند. برای مثال گلیکواسفنگولیپیدهای GM1 در اسپرم‌ها و گلیکواسفنگولیپیدهای GM3 در سلول‌های سرتولی لوله‌های منی ساز وجود دارند. در مراحل اولیه اسپرم‌زایی، سرامید و اسفنگومیلین در مرحله اسپرماتوسیت ظاهر می‌شود و ترکیبات عمده ای از سر اسپرم پستانداران را تشکیل می‌دهد [۳]. تغییرات اسفنگولیپیدی در جریان اسپرم‌زایی نقش مهمی را در باروری مردان ایفا می‌کند. تحقیقات نشان داده است که اسفنگولیپیدها در تنظیم فرایندهای مختلف سلولی مانند تمایز، آپوپتوز و گامتوز درگیر هستند. بخصوص ساختارهای تخصصی شده اسفنگولیپیدها برای ثبات اتصالات بین سلولی در اسپرماتیدها و در نتیجه باروری مردان ضروری است. با این وجود، اسفنگولیپیدهایی مانند سرامید القا کننده آپوپتوز هستند و اسفنگوزین ۱-فسفات به عنوان فاکتور بقا عمل می‌کنند و برای محافظت سلول‌های زایا از مرگ سلولی القا شده با استرس‌های خارج سلولی ضروری هستند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که درگیری پیچیده‌ای از اسفنگولیپیدها در حفظ عملکردهای بیضه‌ای، گامتوز و حفاظت در مقابل آپوپتوز در جریان اسپرم‌زایی وجود دارد و بر اهمیت‌شان در سلامت باروری مردان تاکید می‌کند [۳].

سلول‌های اسپرماتوگونی که اساس اسپرماتوزن هستند به وسیله یک ریزمحیط تخصصی به نام نیچ سلول‌های بنیادی



شکل ۳. میزان انواع مختلف سرامید در نمونه‌های الیگوزواسپرمی و نرموزواسپرمی. نتایج تفاوت معنی‌داری را در مقادیر Cer16، Cer14، Cer18 و Cer20 در گروه الیگوزواسپرمی در مقایسه با نرموزواسپرمی نشان می‌دهد. $P < 0.0001$.

بحث

نتایج حاضر نشان می‌دهد که اسفنگوزین و سرامید نقش بسیار مهمی بر کمیت اسپرماتوزن دارند. به طوریکه تغییرات این اسفنگولیپیدها نسبت به حالت طبیعی، منجر به کاهش تعداد اسپرم و الیگوزواسپرمی در مردان می‌شود و پتانسیل باروری را کاهش می‌دهد. از این میان تغییرات سرامیدها در میان نمونه‌های الیگوزواسپرمی بسیار زیاد نشان دادند.

مطالعات نشان داده است که در بافت‌های غیرعصبی، افزایش سرامید ۱۶ به دلیل آپوپتوز خواهد بود. اگرچه سرامید می‌تواند از اسفنگومیلین‌ها و به وسیله اسفنگومیلینازها ایجاد شود، اما سرامید میتوکندریایی با آپوپتوز همراه است و سرامید تولید شده در سایر قسمت‌های سلول بر این مکانیسم مرگ تأثیری ندارد [۱۱]. در مطالعه‌ای دیگری نشان داده شده است که میتوکندری‌ها از لوله‌های منی ساز موش صحرائی بالغ دارای سرامید و

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مطالعه از مساعدت صمیمانه همکاران مرکز درمان ناباروری الزهرای رشت در تهیه نمونه‌های سیمین بسیار سپاسگزارند.

منابع

- [1] Li X, Luo T, Li H, Yan N. Sphingomyelin Synthase 2 Participate in the Regulation of Sperm Motility and Apoptosis. *Molecules*. 2020; 25(18): 4231.
- [2] World Health Organization (WHO), WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, sixth ed., 2021. Geneva.
- [3] Wang D, Tang Y, Wang Z. Role of sphingolipid metabolites in the homeostasis of steroid hormones and the maintenance of are the major acyl groups of sphingomyelins and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. *J Biol Chem*, 2007; 282(25): 18151-18161.
- [4] Oresti GM, Reyes JG, Luquez JM, Osses N, Furland NE, Avelaño MI. Differentiation-related changes in lipid classes with long-chain and very long-chain polyenoic fatty acids in rat spermatogenic cells. *J Lipid Res*. 2010; 51(10): 2909-2921.
- [5] Molina-Mora JA, Mesen-Porras S, Quiros-Fernandez I, Kop-Montero. M, Rojas-Céspedes A, Quiros S, Siles F, Mora R. Sphingolipid pathway as a biosensor of cancer chemosensitivity: a proof of principle. *Uniciencia*, 2022; 36(1):1-15.
- [6] Rollin-Pinheiro R, Rochetti VP, Xisto MIDDs, Liporagi-Lopes LC, Bastos B, Rella A, Singh A, Rozental S, Del Poeta M, Barreto-Bergter E. Sphingolipid biosynthetic pathway is crucial for growth, biofilm formation and membrane integrity of *Scedosporium boydii*. *Future Med Chem*. 2019; 11(22): 2905-2917.
- [7] Tilly JL, Kolesnick RN. Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility. *Biochim Biophys Acta*, 2002;1585:135-138
- [8] Merrill AH Jr, Wang E, Mullins RE, Jamison WCL, Nimkar S, Liotta DC. Quantitation of free sphingosine in liver by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 1988; 171: 373-281.
- [9] Groener JE, Poorthuis BJ, Kuiper S, Helmond MT, Hollak CE, Aerts JM. HPLC for simultaneous quantification of total ceramide, glucosylceramide, and ceramide trihexoside

اسپرماتوگونی حمایت می‌شود. تکوین بعد از تولد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به وسیله تغییرات متابولیکی مشخصی تعیین می‌شود. درک فاکتورهای نیچ که این حوادث بلوغ را تنظیم میکند، برای کاربرد کلینیکی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در حفظ باروری مردانه بسیار ضروری است. بلوغ مورفولوژیکی نیچ با تجمعات قطرات لیپیدی همراه است. آنالیز پروتئومیکس نشان می‌دهد که تغییرات لیپید نیچ در این فرایند بسیار موثر است [۱۳]. متابولیت‌های اسفنگولیپیدها، بخصوص اسفنگوزین و اسفنگوزین ۱- فسفات نقش حیاتی در سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از طریق میانجی‌گری فرایندهای سیگنالینگ سلولی و حفظ ویژگی‌های بنیادی سلول ایفا می‌کنند و در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی درگیر هستند [۱۴]. همچنین سرامید یک متابولیت عمده اسفنگولیپیدی است که به عنوان پیامبر ثانویه عمل می‌کند که می‌تواند منجر به توقف چرخه سلولی و آپوپتوز شود و حفظ سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی و در نتیجه فرایند اسپرم‌زایی را تحت تاثیر قرار دهد [۱۵]. بنابراین اسفنگولیپیدها ترکیبات ضروری غشاهای سلولی هستند و در عبور و مرور پروتئین‌های درون سیستم‌های درون غشایی دخالت دارند و توزیع درست پروتئین‌ها برای عملکردهای سلولی من جمله سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را برعهده دارند [۱۶]. با شناخت نقش دقیق اسفنگولیپیدها و شناخت تغییرات آنها در جریان اسپرم‌زایی می‌تواند دیدگاه جدیدی را در ناباروری مردان و روش‌های درمانی بالقوه برای سلامت باروری معرفی نماید [۳].

در مجموع، مطالعه حاضر نشان می‌دهد که یکی از اتفاقات مهم در جریان اسپرم‌زایی تغییرات در سرامیدها و اسفنگوزین است که به طور معنی‌داری این تغییرات در نمونه‌های الیگوزواسپرمی در مقایسه با نرموزواسپرمی مشاهده شد. با توجه به مسیر متابولیسم اسفنگولیپیدها، به نظر می‌رسد که اسفنگوزین تولید شده و افزایش در مقدار اسفنگوزین، بیشتر در جهت تولید سرامید و در نهایت تاثیر منفی بر اسپرم‌زایی پیش می‌رود و منجر به الیگوزواسپرمی می‌شود. بنابراین درگیری این متابولیت‌های اسفنگولیپیدی در فیزیولوژی تولیدمثلی مردان و نقش احتمالی در حوادث پاتولوژیکی مرتبط با باروری و لقاح اسپرم پیشنهاد می‌شود.

- concentrations in plasma. *Clin Chem*, 2007; 53(4): 742-747.
- [10] Fillet M, Van Heugen JC, Servais AC, De Graeve J, Crommen J. Separation, identification and quantitation of ceramides in human cancer cells by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2002; 949(1-2): 225-233.
- [11] Birbes H, El Bawab S, Hannun YA, Obeid LM. Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *FASEB J*, 2001; 15(14): 2669-2679.
- [12] Furland NE, Oresti GM, Antollini SS, Venturino A, Maldonado EN, Aveldaño MI. Very long-chain polyunsaturated fatty acids are the major acyl groups of sphingomyelins and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. *J Biol Chem*, 2007; 282(25): 18151-18161.
- [13] Voigt AL, Dardari R, Lara NLM, He T, Steele H, Dufour A, Orwig KE, Dobrinski I. Multiomics approach to profiling Sertoli cell maturation during development of the spermatogonial stem cell niche. *Mol Hum Reprod*, 2023; 29(3): gaad004.
- [14] Salman B, Ronald H, Hill A, Liu YY. *The Role of Sphingolipids in Modulating Pluripotency of Stem Cells*. Springer, 2013; 167-191.
- [15] Gomez-Larrauri A, Presa N, Dominguez-Herrera A, Ouro A, Trueba M, Gomez-Muñoz A. Role of bioactive sphingolipids in physiology and pathology. *Essays Biochem*, 2020; 64(3): 579-589.
- [16] Aguilera-Romero A, Lucena R, Sabido-Bozo S, Muñoz M. Impact of sphingolipids on protein membrane trafficking. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2023; 1868(8): 159334.

مقاله پژوهشی

اثر سیتوتکسیتی توأم داروهای کپسیتابین و ملاتونین روی رده‌های سلولی HER2 مثبت (SK-BR-3) و HER2 منفی (MCF-7) سرطان پستان انسانی و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

سپیده شایان^۱، لعیبا تکبیری اسکویی^{۲*}، فاطمه جوانی جونی^۳

^۱ دکتری گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^{۲*} استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳ استادیار گروه بیوشیمی - بیوفیزیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): layatakbiri536@gmail.com

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۲

چکیده

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در زنان است. ملاتونین، یک ایندول آمین طبیعی سنتز شده در غده صنوبری می‌باشد. مطالعات زیادی نشان می‌دهند که ملاتونین به دلیل داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک می‌تواند کاندیدی جذاب برای درمان ترکیبی سرطان باشد. فرض مطالعه حاضر بر این است که ملاتونین در ترکیب با کپسیتابین ممکن است اثر هم افزایی در رده‌های سلولی سرطان پستان MCF-7 و SK-BR-3 نشان دهند. برای مطالعه اثر داروهای فوق بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به تنهایی و به صورت ترکیبی روی رده‌های سلولی انجام گرفت. نتایج نشان داد در هر دو رده سلولی، استفاده ترکیبی دو دارو منجر به افزایش بیشتر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شده اند خاصیت سینرژستی این دو ترکیب کاملاً در نتایج آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مشهود است استفاده توأم این دو ترکیب منجر به کاهش دوز کپسیتابین می‌گردد که در نتیجه منجر به کاهش اثرات جانبی این دارو خواهد شد.

کلیدواژه‌ها: ملاتونین، کپسیتابین، سرطان پستان، MCF-7، SK-BR-3، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز.

مقدمه

تشخیص داده شده است و سرطان پستان در ۱۲٪ از کل زنان در ایالات متحده در طول عمر آن‌ها تشخیص داده می‌شود [۲]. سرطان پستان دارای یک تشخیص بافت شناسی است که طبق معیارهای استاندارد پاتولوژیک انجام می‌شود. شایع‌ترین

در سراسر جهان، بعد از سرطان پوست غیر ملانوما، سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان است [۱]. بیش از ۲۵۰ هزار مورد جدید سرطان پستان در سال ۲۰۱۷ در ایالات متحده

گیرنده‌های MT1 و MT2 هر دو در ارگان‌های مختلف بیان می‌شوند [۸] مطالعات بیشماری نشان داده‌اند که ملاتونین بر روی انواع بدخیمی‌ها اثرات آنکوآستاتیک دارد و اثرات آن بر سرطان پستان نیز مورد مطالعه گسترده‌ای است [۹]. داده‌های کلینیکی و همچنین مطالعات حیوانی شواهدی را ارائه داده‌اند که نشان می‌دهد، ملاتونین بروز سرطان‌های آزمایشی را کاهش می‌دهد و رشد برخی از تومورهای پستان انسان را به میزان قابل توجهی مهار می‌کند [۱۰، ۱۱]. به طور کلی، مشخص شده است که ملاتونین از طریق مکانیسم‌های مختلفی اثرات سیتوتوکسیک ضدپرولیفراتیو و اثرات سیتوتوکسیک آپوپتوزی خود را در سلول‌های سرطانی پستان اعمال می‌کند [۱۲].

فلونوروراسیل^۸ یکی از قدیمی‌ترین و پرمصرف‌ترین داروهای سیتوتوکسیک است. فعالیت ضد توموری آن به طور کلی به مهار سنتز تیریمیدین و اختلال در تکثیر DNA به واسطه تشکیل یک کمپلکس سه گانه با تیمیدیلات سنتاز^۹ و ۵،۱۰-متیلن تراهایدروفولات و یک متابولیت اسید فولینیک نسبت داده می‌شود [۷، ۸]. قرار گرفتن طولانی مدت سلول‌های بدخیم در معرض فلونوروراسیل و شدت دوز بالا برای یک برنامه معین از تجویز برای به حداکثر رساندن فعالیت ضد توموری و بهره مندی بیمار از درمان ضروری است [۱۴، ۱۵].

کپسیتابین^{۱۰} یک کاربامات فلوروپیریمیدین جدید است که به عنوان یک ۵'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) و به صورت خوراکی طراحی شده است. کپسیتابین در حال حاضر در حداقل ۴۵ کشور از جمله ایالات متحده آمریکا و کانادا برای بیماران مبتلا به سرطان پستان مقاوم در برابر تاکسان^{۱۱} تأیید شده است [۱۳، ۱۴].

گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و گونه‌های نیتروژن فعال، از جمله سوپر اکسید آنیون ($O_2^{\bullet-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، پراکسی نیتريت ($-ONOO$) و اکسید نیتريك ($\bullet NO$)، به طور یکپارچه در انتشار سیگنال در فیزیولوژی، یوکاریوتی دارای نقش ضروری هستند. به این ترتیب، سیگنال‌دهی ROS با پیری، آسیب شناسی‌های قلبی عروقی،

بافت شناسی سرطان پستان، کارسینوم داکتال تهاجمی^۱ است (۷۵-۵۰ درصد از بیماران) و پس از آن سرطان کارسینوم لوبولار تهاجمی^۲ (۱۵-۵ درصد بیماران)، همراه با کارسینوم داکتال/لوبولار^۳ مخلوط و سایر موارد نادر که باقی مانده بیماران را تشکیل می‌دهد [۳].

دو هدف اصلی مولکولی در پاتوزن سرطان پستان مشخص شده است. یکی از آنها گیرنده استروژن آلفا^۴ است که تقریباً در ۷۰٪ از سرطان‌های تهاجمی پستان بیان شده است. ER α یک گیرنده هورمون استروئیدی و یک فاکتور رونویسی است که با فعال شدن توسط استروژن، مسیرهای رشد انکوژنیک را در سلول‌های سرطانی پستان فعال می‌کند. بیان گیرنده هورمون پروژسترون استروئیدی همچنین یک نشانگر سیگنالینگ ER α است [۴]. هدف اصلی مولکولی دوم عامل رشد اپیدرمی^۵ است که یک گیرنده تیروزین کیناز داخل غشایی در خانواده گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی است و تقریباً در ۲۰٪ از سرطان‌های پستان تقویت و یا بسیار بیان می‌شود [۵]. بنابراین سرطان پستان بر اساس وجود یا عدم وجود نشانگرهای مولکولی در گیرنده‌های استروژن یا پروژسترون و فاکتور رشد اپیدرمال انسانی ۲ (ERBB2؛ یا همان HER2) به ۳ زیر گروه اصلی طبقه بندی می‌شود: گیرنده هورمون مثبت HER2 منفی (۷۰٪ بیماران)، HER2 مثبت (۲۰-۱۵ درصد) و سه گانه منفی (تومورهای فاقد هر سه نشانگر مولکولی استاندارد؛ [۲]).

ملاتونین^۶ هورمونی است که توسط لرنر^۷ و همکارانش کشف شد و از غده اپی فیز پستانداران ترشح می‌شود [۶، ۷]. بسیاری از اثرات ضد سرطانی ملاتونین در درجه اول از طریق اتصال به دو گیرنده غشایی مرتبط با پروتئین G (GPCR) انجام می‌شود. این دو GPCR که در انسان و پستانداران یافت می‌شوند، شامل گیرنده MT1 ملاتونین (قبلاً Mel1a) هستند که توسط ژن MTNR1A و گیرنده MT2 ملاتونین (قبلاً Mel1B) رمزگذاری شده توسط ژن MTNR1B هستند.

¹ invasive ductal carcinoma

² invasive lobular carcinoma

³ ductal/lobular carcinomas

⁴ Estrogen Receptor α

⁵ Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

⁶ N-acetyl-5-methoxytryptamine

⁷ Lerner

⁸ 5-fluorouracil; FU-5

⁹ thymidylate synthase

¹⁰ Capecitabine [®] Xeloda با نام تجاری

¹¹ taxane

مشکل در خواب و یا تغییر در طعم ایجاد کند. حالت تهوع و استفراغ معمولاً به صورت شدید ایجاد می‌شوند. اسهال از عوارض جانبی رایج این دارو است. یکی دیگر از عوارض جانبی این دارو ریزش موی موقت است. رشد طبیعی مو باید پس از پایان درمان برگردد. همچنین ممکن است تغییرات موقتی ناخن ایجاد شود. کپسیتابین ممکن است باعث گردد بیمار یک مشکل پوستی به نام سندرم دست و پا پیدا کند [۱۸]. بنابراین دست یابی به روش درمانی که اثرات جانبی کپسیتابین را کاهش دهد از اهمیت بسیاری برخوردار است. ترکیب کپسیتابین با ملاتونین احتمالاً بتواند از اثرات جانبی داروی کپسیتابین کاسته و همچنین ترکیب این دو دارو اثر درمانی بیشتری داشته باشد. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی اثر توأم درمانی داروی کپسیتابین و ملاتونین بر روی سلول‌های سرطانی پستان می‌باشد.

مواد و روش کار

کشت سلول و رده‌های سلولی مورد استفاده

سلول‌های رده سرطانی C207 SK-7 (C135) MCF-7 و BR-3 پستان به صورت یخ‌زده در نیتروژن مایع از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS)^۲ و ۱ درصد پنسیلین استرپتومایسین جهت جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها در شرایط رشد مورد نیاز (دمای ۳۷ درجه سلسیوس - ۵% CO₂) کشت داده شدند.

تهیه غلظت‌های مختلف ترکیبات

جهت انجام آزمون غلظت‌های IC₅₀ بدست آمده طبق مطالعه شایان و همکاران استفاده گردید IC₅₀ غلظتی از دارو است که به میزان ۵۰% خاصیت مهارکنندگی یک فعالیت بیولوژیکی را داشته باشد (۱۹)

X 200

ΔOD Control

به این منظور غلظت‌های IC₅₀، ۴/۵۲ mM، μg/ml ۶۱۹/۳۶ برای ملاتونین (Cas no. 73-31-4) و کپسیتابین (Cas No. 154361-50-9) به ترتیب در رده سلولی MCF-

التهاب، تخریب عصبی و سرطان مرتبط است. یکی از اجزای آنزیمی ضروری سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتازهای وابسته به یون فلزی (SODs) هستند. سه عضو از خانواده SOD در فیزیولوژی پستانداران وجود دارد. همه اعضای خانواده SOD به کوفاکتورهای فلزی برای کاتالیز اکسیداسیون الکترون و به دنبال آن کاهش الکترونی O₂•- نیاز دارند. انتظار می‌رود که هر یک از اعضای خانواده SOD نقش‌های تقسیم‌بندی شده خاصی مانند تنظیم فاکتورهای رونویسی حساس به ردوکس، سنجش سطح اکسیژن میتوکندریایی یا محافظت از بافت اطراف در برابر التهاب اکسیداتیو در طول عفونت بر عهده داشته باشند.

اثرات سرکوب‌کننده تومور MnSOD و Cu/ZnSOD به خوبی توصیف شده است [۱۶] اعتقاد بر این است که سوپراکسیداز به‌عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده به روشی متمایز از مولکول‌های واسطه‌شده توسط H₂O₂، •OH، و ONOO- عمل می‌کند، اگرچه مکانیسم آن به‌طور کامل شناخته نشده است. نام سوپراکسید آنیون به این معنا گمراه‌کننده است که یک سوپر اکسیدان نیست بلکه یک احیا کننده نسبتاً متوسط است. با این حال، سوپراکسید که هم یک رادیکال و هم یک آنیون است، می‌تواند با مکانیسم هسته دوست با مولکول‌های آلی واکنش دهد. به دلیل این خاصیت هسته دوست، سوپراکسید قادر است الکل‌ها، فنل‌ها و تیول‌ها را به سرعت پروتون زدایی کند و استرها را هیدرولیز کند [۱۷]. با پروتون زدایی از باقی مانده‌های پروتئینی سرین یا ترئونین، سوپراکسید آنیون می‌تواند واسطه فسفوریلاسیون پروتئین‌های متعدد توسط پروتئین کینازها شود و در نتیجه سرعت واکنش هسته دوست بین کینازها و پروتئین‌های فسفریله کننده را تسریع کند. به عنوان مثال، نشان داده شده است که سوپراکسید در فعال شدن بسیاری از پروتئین کینازها و کینازهای فعال شده با میتوزن. یکی دیگر از محرک‌های مهم فسفوریلاسیون آنزیمی توسط سیگنال دهی سوپراکسید آنیون از طریق فعال سازی فسفاتیدیل لینوزیتول ۳-کیناز است که متعاقباً MAPK و PKB را فعال می‌کند [۱۶].

مصرف داروی کپسیتابین ممکن است حالت تهوع، استفراغ، از دست دادن اشتها، یبوست، خستگی، ضعف، سردرد، سرگیجه،

² Fetal Bovin serum

¹ superoxide dismutases

توسط غلظت IC_{50} ملاتونین و کپسیتابین و همچنین استفاده توأم از آن‌ها پرداخته شده است. در نمودار ۱ میزان سوپر اکسید دیسموتاز در مایع رویی سلول‌ها آورده شد سوپر اکسید دیسموتاز در مایع رویی سلول‌ها آورده شده است.

ملاتونین و کپسیتابین در هر دو رده سلولی منجر به افزایش معنی‌دار میزان SOD در سلول‌های SK-BR-3 و MCF-7 نسبت به سلول‌های تیمار نشده (کنترل) شده است. ترکیب ملاتونین + کپسیتابین افزایش بیشتر میزان SOD را منجر شده‌اند. خاصیت سینرژیستی این دو ترکیب کاملاً در نتایج SOD مشهود است و اختلاف آن معنی‌دار می‌باشد ($P-Value < 0.05$). البته افزایش میزان SOD در رده سلولی SK-BR-3 بیشتر از رده سلولی MCF-7 است.

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان به گروهی از بیماری‌ها اطلاق می‌گردد که با رشد و تهاجم غیرطبیعی سلول‌ها مشخص شده و می‌تواند از محل منشأ یا محل اولیه به سایر قسمت‌های بدن سرایت کند. در این تعریف باید به چند نکته تأکید شود. سرطان به‌عنوان گروهی از بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود. بیش از ۱۰۰ نوع سرطان طبقه‌بندی شده است. بافت مورد نظر منشأ ویژگی‌های متمایز سرطان را نشان می‌دهد. حدود ۸۵ درصد از سرطان‌ها از سلول‌های اپیتلیال منشأ گرفته و به‌عنوان کارسینوم طبقه‌بندی می‌شوند. سرطان‌های ناشی از سلول‌های مزودرم (مانند استخوان، ماهیچه) سارکوم و سرطان‌های بافت غده‌ای (مثلاً پستان) آدنوکارسینوم نامیده می‌شوند. انواع مختلف سرطان ویژگی‌های متفاوتی دارند. [۲۰].

غالب روش‌های درمانی موجود برای مقابله با سرطان پستان دارای اثرات و عوارض جانبی بوده و قادر به حذف انحصاری سلول‌های سرطانی نبوده و به سلول‌های سالم نیز آسیب می‌زند. در همین راستا بخشی از پژوهش‌های اخیر به کاهش این عوارض جانبی پرداخته‌اند [۲۱].

کپسیتابین یک داروی خوراکی فلوتوروراسیل است که برای شیمی‌درمانی کمکی^۲ در سرطان معده استفاده می‌شود [۲۲]. همچنین این دارو برای درمان کمکی سرطان پستان متاستاتیک

7 و غلظت‌های ۵/۱ mM و ۶۷۹/۵۱ $\mu\text{g/ml}$ در رده سلولی SK-BR-3 و همچنین جهت اثر توأم آن‌ها از غلظت ملاتونین (۱/۵۹ mM) و کپسیتابین ($239/4 \mu\text{g ml}^{-1}$) جهت تیمار روی سلول‌ها تهیه و استفاده گردید. [۱۹]

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

جهت انجام این سنجش از کیت NasdoxTM شرکت ناوند سلامت استفاده گردید.

برای این منظور محیط کشت حاوی حداقل 10^6 سلول در ۸۰۰ دور به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و مایع رویی دور ریخته شد. سلول‌های ته نشین شده با بافر PBS خنک شسته شده و مرحله قبلی دوباره تکرار شد. سپس سلول‌ها با ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر لیزکننده به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت یخ قرار داده شدند. در نهایت سلول‌ها همراه بافر سانتریفیوژ گشته (۱۲۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) و از مایع رویی^۱ به عنوان نمونه استفاده شد. مراحل انجام تست به ترتیب طبق جدول ۱ انجام شد. اختلاف جذب نوری نمونه و کنترل در زمان صفر تا ۳ دقیقه با فاصله ۱ دقیقه قرائت و میانگین اختلاف آن‌ها به عنوان ΔOD در فرمول زیر مورد محاسبه فرار گرفت.

$$\text{SOD activity} = \Delta OD \text{ Test} \quad (\text{U/ml})$$

جدول ۱- معرف‌های مورد استفاده در لوله‌های نمونه و کنترل در سنجش سوپراکسید دیسموتاز

معرف	لوله نمونه (میکرولیتر)	لوله کنترل (میکرولیتر)
نمونه	۵۰۰	-
معرف یک (R1)	۲۰۰۰	۲۰۰۰
آب دیونیزه (DW)	-	۵۰۰
معرف بعدی را باید در داخل اسپکتروفتومتر اضافه نموده و زمان‌ها را مد نظر داشته باشید		
معرف دو (R2)	۵۰۰	۵۰۰
خوانش در طول موج ۴۲۰ نانومتر		

نتایج

در این مطالعه توسط کیت NasdoxTM به بررسی میزان سوپر اکسید دیسموتاز در رده سلول‌های مورد بررسی پس از تیمار

² adjuvant chemotherapy

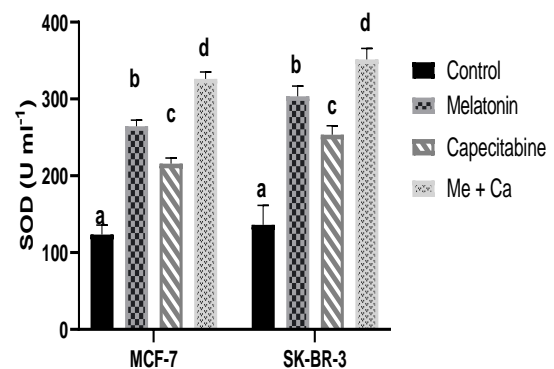
¹ Supernatant

ملاتونین بر آنژیوز در سرطان پستان انجام دادند. میزان زنده مانی سلولی با استفاده از روش MTT پس از درمان ملاتونین در سلول‌های سرطانی سه گانه منفی اندازه‌گیری شد. پس از آن، سلول‌ها در موش‌ها قرار داده شدند و روزانه با ملاتونین درمان قرار گرفتند، ملاتونین در شرایط آزمایشگاهی (۱ میلی مولار) باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌ها شد ($p < 0.05$). موش‌های مبتلا به سرطان پستان تحت تیمار با ملاتونین نشان داد که اندازه تومور و تکثیر سلولی (Ki-67) در مقایسه با حیوانات شاهد بعد از ۲۱ روز درمان کاهش یافته است ($p < 0.05$). در نتیجه، درمان ملاتونین در کاهش رشد تومور و تکثیر سلولی و همچنین در مهار آنژیوز اثر بخشی معنی‌داری را نشان داد [۲۷].

در مطالعه Shen و همکاران در سال ۲۰۱۸، به بررسی اثر توأم استفاده از ملاتونین با داروی ضد سرطانی پرداخته‌اند. نتایج آن‌ها نشان داد که درمان ترکیبی راپامایسین و ملاتونین باعث کاهش زنده مانی سلولی، تکثیر و ظرفیت کلونوژنیک می‌شود. درمان ترکیبی با راپامایسین و ملاتونین با تغییرات در عملکرد میتوکندری با افزایش تولید ROS، افزایش آپوپتوز و میتوفاژی همراه است. به طور کلی، یافته‌های آن‌ها نشان می‌دهد که ملاتونین می‌تواند به عنوان یک ماده کمکی همراه با راپامایسین مورد استفاده قرار گیرد، در حالی که اثرات جانبی آن را به حداقل می‌رساند و اثربخشی را بهبود می‌بخشد [۲۸].

در مطالعه مشابه دیگری که توسط Wu و همکاران در سال ۲۰۲۲ انجام گرفته است به بررسی اثر هم‌زمان استفاده از ملاتونین و MA-۳ بر سلول‌های سرطان پستان پرداخته است. نتایج این مطالعه نشان داد تیمار با ملاتونین به طور قابل توجهی تکثیر سلول‌های سرطان پستان را به روشی وابسته به غلظت و زمان ($P < 0.05$)، کاهش داد، توانایی تشکیل کلونی و همچنین مهاجرت سلولی را سرکوب ($P < 0.01$) و آپوپتوز سلول‌ها را القا کرده است ($P < 0.01$). همچنین درمان ملاتونین به تنهایی به طور قابل توجهی بیان Bax و Beclin1 را افزایش داد و بیان Bcl2 و P62 را کاهش داد. در مقایسه با درمان ملاتونین به تنهایی، درمان ملاتونین همراه با MA-۳ به طور قابل توجهی بیان Beclin1، LC3-II/LC3-I، Bax و E-cadherin را کاهش داد. این محققین نتیجه گرفتند که ملاتونین می‌تواند باعث اتوفاجی

پس از استفاده از آنتراسایکلین‌ها^۱ و تاکسان‌ها^۲ تأیید شده است [۲۳]. کپسیتابین در ترکیب با داورهای دیگر مانند pyrotinib، neratinib و lapatinib برای درمان سرطان پستان متاستاتیک HER2 مثبت استفاده شده است [۲۴، ۲۵]. همچنین ترکیب کپسیتابین با bevacizumab در درمان سرطان HER2 منفی استفاده شده و مرگ و میر در این افراد را کاهش داده است [۱۹]. در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای توسط Masuda و همکاران پیرامون بررسی اثر درمانی کپسیتابین بر افراد دارای سرطان پستان HER2 منفی انجام گرفت. در این مطالعه ۹۱۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان HER2 منفی بررسی شد. این افراد شیمی درمانی با نئودجوانت را انجام داده بودند (آنتراسایکلین، تاکسان یا هردو). تجزیه و تحلیل نهایی نشان داد که زنده مانی همراه با عدم بیماری در گروه درمان شده با کپسیتابین بیشتر از گروه کنترل بود (۷۴/۱٪ در مقابل ۶۷/۶٪). بقای کلی در گروه کپسیتابین طولانی تر از گروه کنترل بود (۸۹/۲٪ در مقابل ۸۳/۶٪) [۳۳].



نمودار ۱- میزان فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در سوپرناتانت سلول‌های MCF-7 و SK-BR-3 پس از تیمار توسط کپسیتابین، ملاتونین و ترکیب آن‌ها. سلول‌ها در معرض غلظت IC_{50} ترکیبات قرار گرفتند، حرف‌های متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P -Value < 0.05 می‌باشد، Me: ملاتونین، Ca: کپسیتابین

* p-value < 0.05 & (n=3) (Bar: Mean \pm SD)

مطالعات مختلفی به بررسی اثرات ضد سرطانی ملاتونین پرداخته‌اند، به عنوان مثال Jardim-Perassi و همکاران در سال ۲۰۱۴، یک مطالعه آزمایشگاهی برای ارزیابی اثرات درمان

¹ anthracyclines
² taxanes

فعالیت SOD به طور کلی در سلول‌های سرطانی در مقایسه با هم‌تایان طبیعی آنها کمتر است، که قبلاً توسط Oberley و Buettner بررسی شده بود. نشان داده شد که بیان بیش از حد SOD در سلول‌های سرطانی، سلول‌ها را به الگوی رشدی مشابه با سلول‌های طبیعی باز می‌گرداند [۳۲]. در مطالعه حاضر نیز درمان با ملاتونین و کپسیتابین به ویژه درمان توأم این دو ترکیب منجر به افزایش معنی‌دار SOD در سلول‌های سرطانی شده است. خاصیت سینرژستی این دو ترکیب کاملاً در نتایج SOD مشهود است.

طبق این مطالعه و مطالعات قبلی استفاده توأم این دو ترکیب منجر به کاهش دوز مصرفی کپسیتابین می‌گردد که در نتیجه منجر به کاهش اثرات جانبی این دارو می‌گردد.

منابع

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J.Clin.* 2018;68: 394-424.
- [2] Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *Jama.* 2019; 321:288-300.
- [3] Corben A, Pathology of invasive breast disease. *Surg. Clin.* 2013; 93: 363-392.
- [4] Joshi H, Press MF. Molecular oncology of breast cancer. *The Breast: Elsevier.* 2018; 282-307.
- [5] Wolff AC, Somerfield MR, Dowsett M, Hammond ME, Hayes DF, McShane LM, Saphner TJ, Spears PA, Allison KH. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: ASCO-College of American Pathologists Guideline Update. *J Clin. Oncol.* 2023; 41: 3867-3872.
- [6] Bourin M. Physiology and Pharmacology of Melatonin. *Psychiatry and Neuroscience Update: From Epistemology. Clin. Psychiatry.* 2021; 4: 261-277.
- [7] St Hilaire MA, Ámundadóttir ML, Rahman SA, Rajaratnam SM, Rüger M, Brainard GC, Czeisler CA, Andersen M, Gooley JJ, Lockley SW. The spectral sensitivity of human circadian phase resetting and melatonin suppression to light changes dynamically with light duration. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 2022; 119. 22053-1119.
- [8] Oishi A, Gbahou F, Jockers R. Melatonin receptors, brain functions, and therapies. *Hand Clin Neurol.* 2021; 179: 345-356.

سلول‌های سرطان پستان MDA-MB-231 برای مهار تکثیر سلولی و متاستاز و ترویج آپوپتوز سلولی شده و سرکوب اتوفاژی می‌تواند اثر مهاری ملاتونین را بر رشد و متاستاز سلول‌های سرطان پستان تضعیف کند [۲۹].

Godoy و همکاران در سال ۲۰۲۳ به اثر ترکیبی ملاتونین و Alpelisib بر سلول‌های سرطان پستان پرداخته‌اند. در مطالعه آن هاسنچش MTT نشان داد که MDA-MB-453 و T-47D کاهش زنده‌مانی سلولی را در همه گروه‌ها نشان دادند، به‌ویژه در MDA-MB-453 تیمار شده با ملاتونین و Alpelisib به صورت توأم. p-AKT, PI3K, mTOR و HIF-1 α پس از درمان با Melatonin + Alpelisib در خطوط سلولی MDA-MB-453 و T-47D مهار شدند. بیان کاسپاز-۳ در تمام گروه‌ها در سلول‌های MDA-MB-453 و T-47D افزایش یافت، که این افزایش در گروه ملاتونین + Alpelisib بارزتر بود [۳۰].

در مطالعه دیگری عمل ترکیبی ملاتونین با سیتارابین^۱ یا ABT-737 به کاهش فعالیت تکثیر سلول‌های لوسمیک، کاهش پتانسیل غشایی میتوکندری و افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و Ca₂ سیتوزولی کمک کرد. آن‌ها بیان داشتند که این یافته‌ها از پیشنهاد اولیه مبنی بر اینکه ملاتونین می‌تواند مزایایی برای درمان سرطان ارائه دهد و به عنوان مکملی برای داروهای مورد استفاده در درمان سرطان در نظر گرفته شود، حمایت می‌کند [۳۱].

در مطالعه Shayan و همکاران نتایج حاصل از MTT نشان داد که بین مهار سلولی کپسیتابین و ترکیب ملاتونین - کپسیتابین اختلاف چشمگیری وجود دارد و همچنین استفاده توأم این دو ترکیب منجر به افزایش بیشتر خاصیت سیتوتوکسیتی آن‌ها می‌شود مقادیر CI نشان دهنده‌ی افزایش اثرات مهاری هنگام استفاده هم‌زمان (سینرژسم) می‌باشد. کاسپاز-۳ که اولین کاسپاز مؤثر سلول است و نقش مهمی در عملکرد مرگ سلولی آپوپتوز ایفا می‌کند، توسط ملاتونین - کپسیتابین بیان بیشتری داشت. در کل، نتایج نشان داد که مرگ سلولی ناشی از ملاتونین - کپسیتابین می‌تواند تحت کنترل آپوپتوز وابسته به کاسپاز و Bax/Bcl-2 باشد. [۱۹]

¹ cytarabine

- [9] Franco PI, do Carmo Neto JR, Milhomem AC, Machado JR, Miguel MP. Antitumor effect of melatonin on breast cancer in experimental models: A systematic review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2023; 1878: 188-838.
- [10] Carnevale Galeti AO, Oliveira JG, Pinheiro MG, dos Santos MB, Colombo J, de Almeida Chuffa LG, de Campos Zuccari DA. Verification of agomelatine in comparison with melatonin as a therapeutic agent to treat breast cancer. *Melatonin res*. 2021; 4: 141-510
- [11] Bonm00ati-Carrion MA, Tomas-Loba A. Melatonin and cancer: A polyhedral network where the source matters. *Antioxid Act*. 2021; 10: 210.
- [12] Talib WH, Alsayed AR, Abuawad A, Daoud S, Mahmood AI. Melatonin in cancer treatment: current knowledge and future opportunities. *Molecules*. 2021; 26: 2506.
- [13] Thomas D, Zalberg J. 5-fluorouracil: a pharmacological paradigm in the use of cytotoxics. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 1998; 25: 887-895.
- [14] [14] Lee JJ, Beumer JH, Chu E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2016;78:447-64.
- [15] Schwartzberg L, Vogel W, Campen C. Methotrexate and fluorouracil toxicities: a collaborative practice approach to prevention and treatment. *The ASCO Post*. 2014; 5: 345-368.
- [16] Griess B, Tom E, Domann F, Teoh-Fitzgerald M. Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free Radic . Biol. Med*. 2017; 112: 464-79.
- [17] [17] Keith CT, Borisy AA, Stockwell BR. Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2005;471-480.
- [18] Alzahrani SM, Al Doghaither HA, Al-Ghafari AB, Pushparaj PN. 5-Fluorouracil and capecitabine therapies for the treatment of colorectal cancer. *Oncol. Rep*. 2023; 50: 1-6.
- [19] Shayan S, Takbiri Osgoei L, Javani Jouni F. Effect of capecitabine and melatonin on HER2+ (SK-BR-3) and HER2- (MCF7) human breast cancer cell lines. *Trop. J. Pharm. Res*. 2023; 22: 1387-1393.
- [20] Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. *World J. Clin. Oncol*. 2016; 7: 54.
- [21] Ashiq MGB. Breast cancer treatment by nanophotolysis Approach. *Results Phys*. 2018; 9: 982-986.
- [22] Zhang Y, Yuan Z, Shen R, Jiang Y, Xu W, Gu M, et al. Identification of biomarkers predicting the chemotherapeutic outcomes of capecitabine and oxaliplatin in patients with gastric cancer. *Oncol Lett*. 2020; 20: 1-10.
- [23] Lluch A, Barrios CH, Torrecillas L, Ruiz-Borrego M, Bines J, Segalla J, et al. Phase III Trial of Adjuvant Capecitabine After Standard Neo-/Adjuvant Chemotherapy in Patients With Early Triple-Negative Breast Cancer (GEICAM/2003-11_CIBOMA/2004-01). *J Clin Oncol*. 2020; 38: 203-213.
- [24] Saura C, Oliveira M, Feng Y-H, Dai M-S, Chen S-W, Hurvitz SA, et al. Neratinib Plus Capecitabine Versus Lapatinib Plus Capecitabine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Previously Treated With ≥ 2 HER2-Directed Regimens: Phase III NALA Trial. *J Clin Oncol*. 2020; 38: 3138-49.
- [25] Xu B, Yan M, Ma F, Hu X-C, Feng JF, Ouyang Q, et al. Pyrotinib or lapatinib plus capecitabine for HER2+ metastatic breast cancer (PHOEBE): A randomized phase III trial. *Am. J. Clin*. 2020; 24: 34-54.
- [26] Lang I, Brodowicz T, Ryvo L, Kahan Z, Greil R, Beslija S, et al. Bevacizumab plus paclitaxel versus bevacizumab plus capecitabine as first-line treatment for HER2-negative metastatic breast cancer: interim efficacy results of the randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 TURANDOT trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14: 125-133.
- [27] Jardim-Perassi BV, Arbab AS, Ferreira LC, Borin TF, Varma NR, Iskander A, et al. Effect of melatonin on tumor growth and angiogenesis in xenograft model of breast cancer. *PloS one*. 2014; 9: 34-45.
- [28] Shen Y-Q, Guerra-Librero A, Fernandez-Gil BI, Florido J, García-López S, Martínez-Ruiz L, et al. Combination of melatonin and rapamycin for head and neck cancer therapy: Suppression of AKT/mTOR pathway activation, and activation of mitophagy and apoptosis via mitochondrial function regulation. *J. Pineal Res*. 2018;64:e12461.
- [29] Wu D, Zhang Y, Tang H, Yang J, Li M, Liu H, et al. [Melatonin inhibits growth and metastasis of MDA-MB-231 breast cancer cells by activating autophagy]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2022; 42: 278-285.
- [30] Godoy BLV, Moschetta-Pinheiro MG, Chuffa LGdA, Pondé NF, Reiter RJ, Colombo J, Zuccari DAPdC. Synergistic actions of Alpelisib and Melatonin in breast cancer cell lines with PIK3CA gene mutation. *Life Sci*. 2023; 324: 121-208.
- [31] Lomovsky AI, Baburina YL, Fadeev RS, Lomovskaya YV, Kobyakova MI, Krestinin RR, et al. Melatonin Can Enhance the Effect

- of Drugs Used in the Treatment of Leukemia. Biochem. (Mosc.). 2023; 88: 73-85.
- [32] Dhar SK, Clair DKS. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. Free Radic. Biol. Med. 2012; 52: 2209-2222.
- [33] Masuda N, Lee S-J, Ohtani S, Im Y-H, Lee E-S, Yokota I, et al. Adjuvant capecitabine for breast cancer after preoperative chemotherapy. New Eng. J.ed. 2017; 376: 2147-2159.



مقاله پژوهشی

سنتز زیستی، بهینه‌سازی و مشخصه‌یابی نانوذرات طلا توسط عصاره بذر گیاه اسطوخودوس

امین باقی زاده^{۱*}، صدیقه زارعی دهسراجی^۲، حسن کریمی مله^۳، محمد علی ابراهیمی^۴

^{۱*} دانشیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

^۲ دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

^۳ عضو هیات علمی گروه مهندسی شیمی، آزمایشگاه نانوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی قوچان، قوچان، ایران

^۴ عضو هیات علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): amin_4156@yahoo.com

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۳

چکیده

گرایش به تولید و استفاده از نانوذرات به دلیل ویژگی آنان در پزشکی و صنعت رو به افزایش است. امروزه نانوذرات فلزی بویژه نانوذرات طلا، در زمینه‌های درمان سرطان، داروسازی، انتقال هدفمند ترکیبات زیستی، تولید لوازم آرایشی بهداشتی و بسیاری از صنایع دیگر به صورت گسترده استفاده می‌شوند. از بین روش‌های تولید نانوذرات در اندازه و میزان مناسب، روش مقرون به صرفه و زیست سازگار استفاده از بافت‌های گیاهی، توجه دانشمندان را به خود جلب نموده است. در این پژوهش، عصاره بذر گیاه اسطوخودوس به روش خیساندن در حرارت تهیه گردید و سپس با ترکیب عصاره حاصله با نیترات طلا و رقیق سازی با آب دیونیزه، نانوذرات طلا تولید گردید. عوامل موثر بر فرآیند تولید نانوذرات از جمله زمان، دما و pH توسط آنالیز طیف سنجی جذبی مرئی - فرابنفش، بررسی و شرایط بهینه سنتز، pH=۹/۵، دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و زمان ۳۰ دقیقه مشخص شد. نتایج نشان داد با افزایش دما و زمان، اندازه و میزان سنتز نانوذرات افزایش می‌یابد و در pH اسیدی هیچ نانوذره‌ای سنتز نگردید. سپس با استفاده از تکنیک‌های پراش پرتوی x و میکروسکوپ الکترونی عبوری، اندازه و ساختار نانوذرات تولید شده بررسی گردید. نتایج نشان داد که نانوذرات طلای تولید شده با ساختار کریستالی و به شکل کروی و همگن با اندازه قطر متوسط ۵۰ نانومتر تولید شده‌اند. همچنین منحنی نایکوئیست الکتروود خمیر کربن ساده و خمیر کربن اصلاح شده با نانو ذرات طلا نیز، بر هدایت الکتریکی نانو ذرات طلا و وجود آنها در عصاره بذر گیاه اسطوخودوس صحت گذاشت.

کلیدواژه‌ها: بیوسنتز، نانوبیوتکنولوژی، *Lavandula angustifolia*، عصاره بذر، نانو ذرات طلا.

مقدمه

در سال‌های اخیر نانو تکنولوژی از یک مفهوم تحقیقاتی به یک حوزه علمی عملیاتی تبدیل شده است [۱]. امروزه فناوری نانو نقش مهمی در توسعه فناوری‌های جدید در زمینه‌های بیوتکنولوژی، کشاورزی، محیط زیست، پزشکی و سلامت دارد [۲و۱]. نانوذرات گروه خاصی از مواد هستند که نسبت به آنالوگ‌های ساختاری همتای خود توانایی بیشتری برای انجام واکنش‌های شیمیایی دارند [۱]. در بین نانوذرات، نانوذرات طلا بیشترین کاربرد را در علوم و فناوری‌های مختلف دارند. نانوذرات طلا قابلیت اتصال به مولکول‌های مختلف از جمله به حسگرها [۳و۴] و کاتالیزورها [۴] را دارند امروزه علاوه بر روش‌های شیمیایی و فیزیکی، روش‌های جدیدی برای تولید نانوذرات فلزی با استفاده از ابزارهای بیولوژیکی مانند باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها و گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد که آسان‌تر و ارزان‌تر هستند. تحقیقات زیادی در مورد سنتز نانوذرات در گیاهان انجام شده است، که ثابت می‌کند این روش بسیار مقرون به صرفه است. بنابراین می‌تواند به عنوان یک جایگزین اقتصادی و ارزشمند برای تولید مقادیر زیاد نانوذرات استفاده شود [۵و۶]. اندام‌های مختلف گیاهی، بذور، صمغ و ترشحات، جهت تهیه عصاره گیاهی در فرآیند تولید نانوذرات فلزی و اکسید فلزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مراحل شکل‌گیری نانوذرات شامل تشکیل هسته به صورت کاهش یون‌های فلزی، تجمع اتم‌ها و رشد هسته پس از ترکیب ذرات ریزتر و تغییر شکل و اندازه آنان تحت شرایط اعمال شده و سپس پایداری نانوذرات به کمک ترکیبات گیاهی است [۷و۱]. عصاره گیاهی حاوی ترکیبات فعال آلکالوئیدی، اسید فنولیک، پلی فنول، پروتئین‌ها، تریپن‌وئیدها، فلاونوئیدها و قند است که مسئول کاهش یون‌های فلزی، پوشش‌گذاری و پایداری نانوذرات سنتز شده، می‌باشند [۸و۶]. گیاهان دارویی حاوی ترکیبات موثره مانند فلاونوئیدها، تریپن‌ها، آلکالوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشند که جزء عوامل اصلی کاهنده بوده و باعث تبدیل ذرات فلزی به نانو ذرات می‌شوند [۹]. مشخص شده است در گیاهان *Cuminum cyminum*، *Cinnamomum zeylanicum* و *Capsicum annuum* ترکیبات موثره پلی فنول^۱

فلاونوئید^۲ و گروه‌های عاملی^۳ در سنتز نانو ذرات طلا و نقره نقش کلیدی داشته‌اند [۱۰، ۱۱ و ۱۲]. سالاری و همکاران در تحقیق انجام شده روی زیره مشخص کردند بیشترین تبدیل یون‌های طلا به نانو ذرات طلا در شرایط بهینه دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، pH=۱۰ و مدت زمان ۲۰ دقیقه با عصاره اندام‌های هوایی این گیاه حاصل می‌شود [۱۱]. اسدی و باقی زاده pH برابر هشت، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و زمان یک ساعت را به عنوان سطوح بهینه سنتز نانوذرات طلا توسط عصاره بذر بنگ‌دانه تعیین کردند [۴]. اسدی و باقی زاده در تحقیقی روی عصاره بذر گل مغربی غلظت ۴۰۰:۲۰۰ میکرولیتر نمک طلا به عصاره بذر، pH مساوی ۱۰، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۲۴ ساعت را به عنوان سطوح بهینه هر فاکتور مشخص کردند [۱۳]. آنالیزهای طیف‌سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، پراش پرتو ایکس (XRD)، پتانسیل زتا (Zeta potential) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) ضمن تایید تولید نانوذرات طلا، اندازه نانوذرات سنتز شده را بین ۱۰-۲ نانومتر نشان دادند [۱۳]. اختلاف در نوع و غلظت ترکیبات فعال موجود در عصاره گیاهان، اساس تغییر در اندازه و شکل نانوذرات سنتز شده است [۱۴]. گیاهان و عصاره اندام‌های مختلف آنها را می‌توان به طور موثر به عنوان مسیر سبز در سنتز نانوذرات مورد استفاده قرار داد. به نظر می‌رسد کنترل اندازه نانوذرات با استفاده از گیاهان بسیار ساده است. سرعت تشکیل ذرات درون سلولی و در نتیجه اندازه نانوذرات را می‌توان تا حد زیادی با کنترل پارامترهایی مانند pH، دما، غلظت بستر و زمان واکنش کنترل کرد [۴و۱۵]. نتایج بررسی پژوهش‌های انجام شده در راستای سنتز زیستی نانوذرات فلزی نشان می‌دهد که بررسی سنتز زیستی نانوذرات طلا توسط عصاره بذر اسطوخودوس تا کنون انجام نشده است. در این پژوهش سنتز نانوذرات طلا در اندازه مناسب با اعمال فاکتورهای pH، دما و زمان مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

سنتز نانوذرات طلا با استفاده از بذر گیاه اسطوخودوس

بذور اسطوخودوس از شرکت پاکان بذر اصفهان و نمک طلا از

² Flavonoid

³ Functional groups

¹ Polyphenol

بررسی شرایط بهینه‌ی زمانی مورد مطالعه قرار گرفت [۴، ۱۸ و ۱۹].

بررسی اثر دما بر سنتز نانوذرات طلا

در این مرحله، برای بررسی اثر دما و تعیین دمای مناسب در زمان بهینه شده‌ی ۳۰ دقیقه در محدوده‌ی دمایی ۲۲، ۳۵ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد طیف‌گیری انجام شد [۴].

بررسی اثر pH بر سنتز نانوذرات طلا

در این مرحله، اثر pHهای مختلف در سطوح ۴، ۸، ۹/۵ و ۱۰ در شرایط زمان بهینه شده‌ی ۳۰ دقیقه و در دمای بهینه شده ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. برای تنظیم شرایط pH از سود و اسید کلریدریک استفاده شد و نمونه‌های سنتزی پس از زمان ۲۴ ساعت برای بررسی طیف جذبی مورد استفاده قرار گرفت [۲ و ۴].

تهیه نمونه جهت آنالیز با دستگاه پراش پرتو ایکس و آنالیز با

دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری

نمونه سنتز شده در دما، زمان و pH بهینه، بعد از سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری شده و پس از خشک شدن، پودر شده و برای آنالیزهای پراش اشعه ایکس و میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد استفاده قرار گرفت [۴ و ۱۱].

آمپدانس الکتروشیمیایی

یکی از جنبه‌های مهم نانوذرات سنتزی توانایی بالای آنها در افزایش رسانندگی الکتریکی و کاهش مقاومت انتقال الکترون در سیستم‌های مبادله الکترون در سطح یک رسانا می‌باشد. به این منظور برای اثبات وجود فعال نانوذرات تولیدی و بررسی تاثیر آنها بر سیگنال‌های الکتریکی، از روش آمپدانس الکتروشیمیایی استفاده شد [۴ و ۱۱].

نتایج و بحث

نتایج تغییر رنگ و طیف سنجی UV-vis

رديابى سنتز نانوذرات در حین فرایند بیوسنتز با استفاده از تغییر

شرکت آلفا ایسر تهیه گردید. برای عصاره‌گیری از بذور از روش خیساندن در حرارت استفاده شد. به این صورت که ۵ گرم بذر پس از توزین، چند مرتبه با آب دیونیزه به منظور حذف آلودگی‌های سطحی شستشو داده شد. سپس به ۱۰۰ میلی لیتر آب در حال جوشیدن اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه عصاره بدست آمده از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شد و از عصاره تازه تولید شده در تمام مراحل آزمایش استفاده گردید [۲، ۴ و ۱۶].

تهیه محلول ذخیره طلا

نمک طلا کلروآئوریک اسید (HAuCl_4) محصول شرکت آلفا ایسر تهیه و محلول ذخیره ۰/۰۱ مولار آن با توزین ۰/۰۰۳ گرم نمک طلا توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم و ترکیب با آب دیونیزه، در حجم ۱۰۰ میلی لیتر تهیه شد و برای تهیه غلظت‌های مورد نظر بعدی نمک طلا از این استوک استفاده گردید [۴ و ۱۳].

بررسی تغییر رنگ و طیف سنجی UV-vis

بررسی تغییر رنگ عصاره بذر پس از اضافه کردن محلول نمک طلا مورد بررسی قرار گرفت. همچنین طیف جذبی عصاره بذر به منظور ارزیابی بیوسنتز نانوذرات طلا توسط عصاره با دستگاه اسپکتروفتومترى و بعد از گذشت ۲۴ ساعت UV-vis (Cary 50 / Conc) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نمودارهای طیف جذبی نمونه‌های مورد مطالعه توسط نرم افزار اکسل (۲۰۰۷) رسم شدند. با توجه به اینکه طلا دارای پیک حداکثر جذب در محدوده ۶۰۰-۵۰۰ نانومتر می‌باشد طول موج‌های ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر برای بیوسنتز نانوذرات طلا در طول آزمایش در نظر گرفته شد. از آب مقطر نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید [۱۱ و ۱۷].

بررسی اثر زمان بر سنتز نانوذرات طلا

در این آزمایش برای بررسی اثر زمان، مقدار ۱۰ میلی لیتر از محلول نمک طلا را با ۱۰ میلی لیتر عصاره‌ی بذر تهیه شده، مخلوط کرده و در زمان‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ دقیقه از نمونه‌ها طیف‌گیری انجام شد و داده‌های به دست آمده برای رسم نمودار و

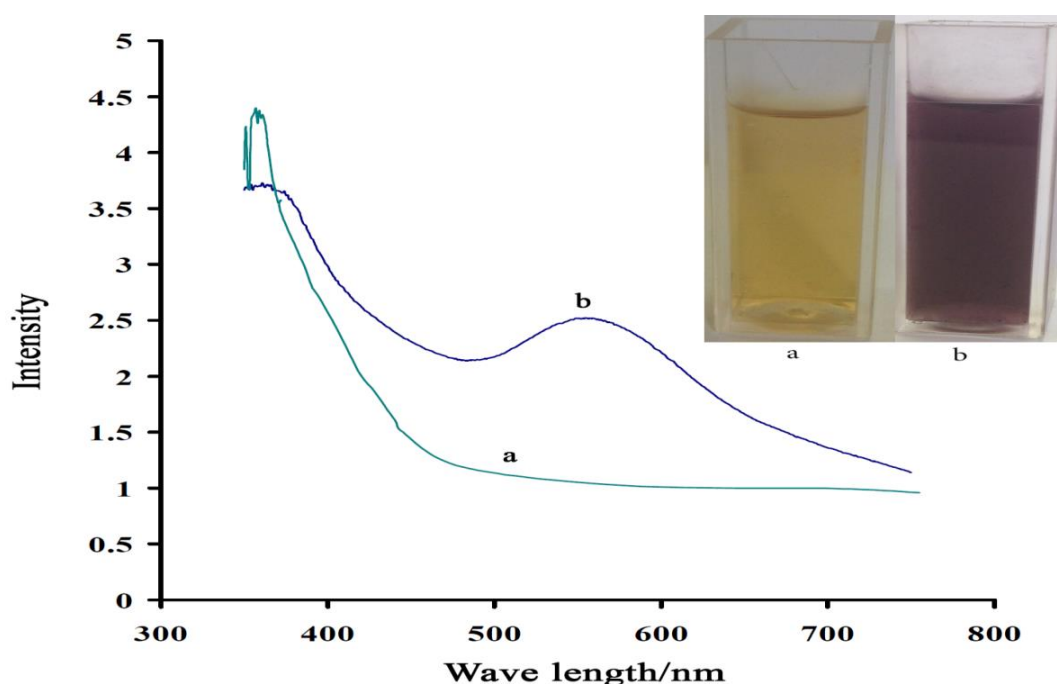
لذا برای ایجاد سرعت در عمل سنتز از یک طرف و از طرف دیگر سنتز کامل نانوذرات، بهینه‌سازی زمان مهم و ضروری است. به این منظور، برای تهیه نمونه مخلوطی از ۱۰ میلی‌لیتر از نمک طلا و ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره بذر بدست آمد و طیف‌های جذب آن پس از ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ دقیقه از مخلوط شدن ثبت گردید. همان‌طور که در شکل ۲- مشاهده شده است با افزایش زمان از ۱۰ تا ۳۰ دقیقه میزان جذب طلا افزایش یافته که این موضوع به افزایش غلظت نانوذرات طلای سنتزی مربوط می‌باشد. اما پس از آن و در مدت ۴۰ دقیقه افزایش تقریباً ثابت و به میزان کمی تغییر می‌کند. این موضوع تایید می‌نماید که زمان ۳۰ دقیقه برای تبدیل تمام یون‌های طلا به نانوذرات کافی بوده و زمان بیش از آن تاثیر معنی داری ندارد.

برای تایید توضیحات داده‌های مربوط به تغییرات ایجاد شده برای سنتز نانوذرات در حین زمان، تغییرات رنگ ایجاد شده در زمان‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ دقیقه نیز ثبت شد (شکل ۳) همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش زمان از ۱۰ تا ۳۰ دقیقه محلول پررنگ‌تر شده و پس از آن تغییر رنگ چشم‌گیر نمی‌باشد. این موضوع تایید بر داده‌های به‌دست آمده از روش جذبی بوده و زمان بهینه شده برای سنتز را تایید می‌کند.

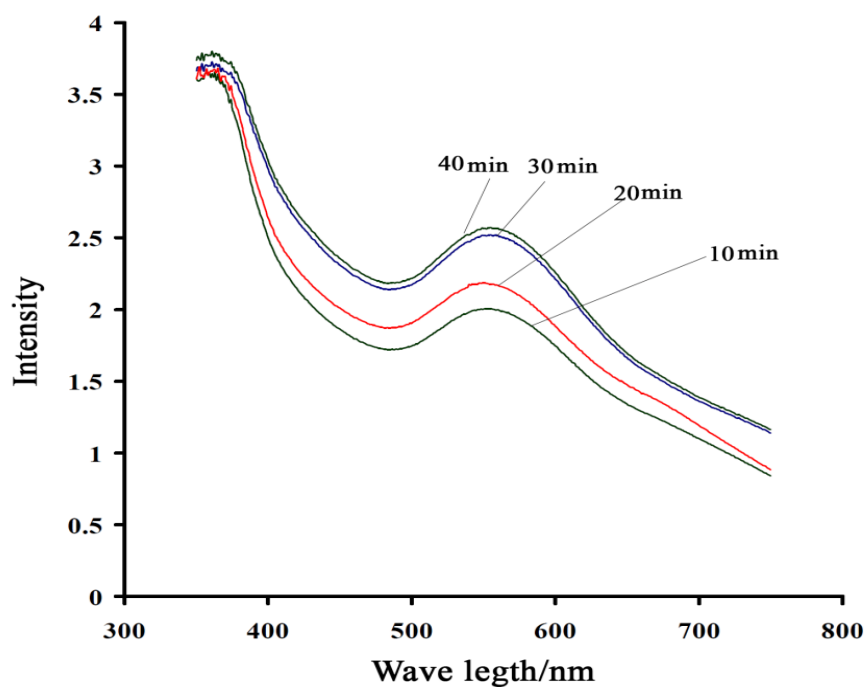
رنگ و طیف‌سنجی جذبی UV-vis انجام شد. شکل ۱- به خوبی نشان می‌دهد که قبل از مخلوط نمودن عصاره بذر با نمک طلا پیک طیف جذبی در محدوده‌ی ۳۵۰ تا ۷۵۰ نانومتر مشاهده نشده است (a). ولی با افزودن عصاره بذر و سنتز نانوذرات طلا طیف جذبی ظاهر می‌شود. این طیف جذبی دارای ماکزیممی در حدود ۵۶۰ نانومتر می‌باشد (b). از طرفی همان‌طور که در شکل ۱- مشاهده می‌شود، محلول طلا دارای رنگ زرد می‌باشد (a) اما پس از مخلوط شدن با عصاره بذر گیاه در شرایط گفته شده بالا، رنگ آن به سمت بنفش تیره متمایل شده است که نشان از سنتز نانوذرات طلا است (b).

بررسی اثر زمان بر بیوسنتز نانوذرات طلا

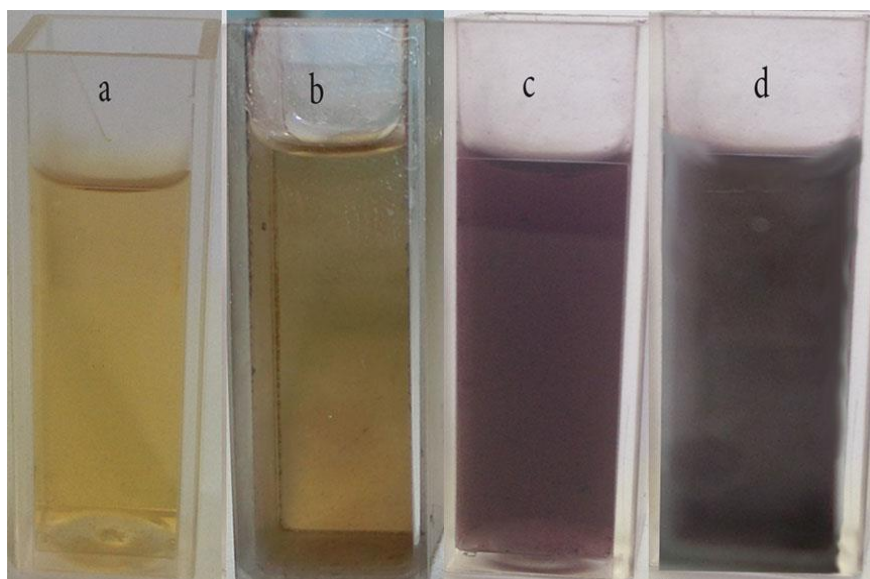
یکی از فاکتورهای مهم در سنتز نانوذرات، زمان است. همان‌طور که می‌دانیم فرایند اکسایش احیای ترکیبات موجود در عصاره می‌تواند باعث احیاء نمک طلا و تبدیل آن به نانوذرات طلا گردد. لذا زمان برای تکمیل این فرایند و احیاء کامل نمک طلا و تبدیل آن به نانوذرات مهم و ضروری است. زمان کم می‌تواند امکان تبدیل تمام یون‌های طلا و تبدیل آن به نانوذرات را مخدوش نماید و زمان زیاد نیز تاثیر بسزایی در این فرایند ندارد.



شکل ۱- بیوسنتز نانوذرات طلا توسط عصاره بذر گیاه اسطوخودوس: لحظه‌ی صفر a، پس از افزودن عصاره بذر به نمک طلا b



شکل ۲- منحنی جذب مریوط به محلول نمک طلا و عصاره بذر اسطوخودوس در زمان‌های مختلف



شکل ۳- بررسی تغییرات رنگ ایجاد شده در محلول نمک طلا و عصاره بذر اسطوخودوس در زمان‌های مختلف (a) ۱۰ دقیقه، (b) ۲۰ دقیقه، (c) ۳۰ دقیقه و (d) ۴۰ دقیقه پس از مخلوط نمودن عصاره و نمک طلا

بررسی اثر دما بر بیوسنتز نانوذرات طلا

یکی از جنبه‌های مورد توجه در سنتز سبز نانوذرات، این است که فرآیند سنتز در دمای اتاق نیز اتفاق می‌افتد. با این حال، درجه حرارت محیط میانکنش، فاکتور بسیار مهمی در تعیین اندازه نانوذرات می‌باشد. پس از بهینه‌سازی زمان اثر عامل دما بر

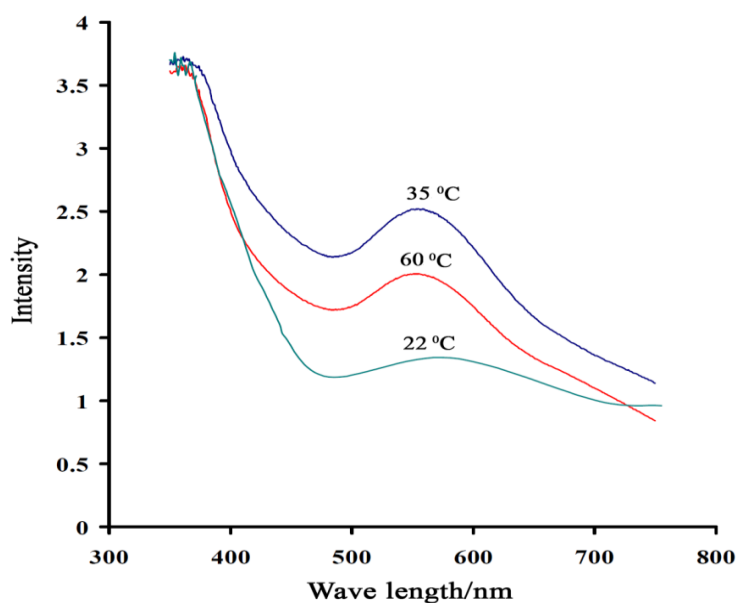
بیوسنتز نانوذرات طلا در محدوده‌ی دمایی ۲۲ (دمای محیط)، ۳۵ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). با افزایش دما از ۲۲ تا ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، به علت افزایش تحرک یون‌های طلا و افزایش فرآیند اکسایش احیا در محلول واکنش، سرعت سنتز نانوذرات افزایش یافته و اندازه‌ی غلظت

نانوذرات سنتزی افزایش می‌یابد. اما با افزایش بیش از حد دما به علت افزایش بیش از حد جنبش مولکولی امکان تشکیل نانوذرات کاهش یافته و غلظت نانوذرات طلا کاهش پیدا خواهد کرد [۲۰ و ۱۳].

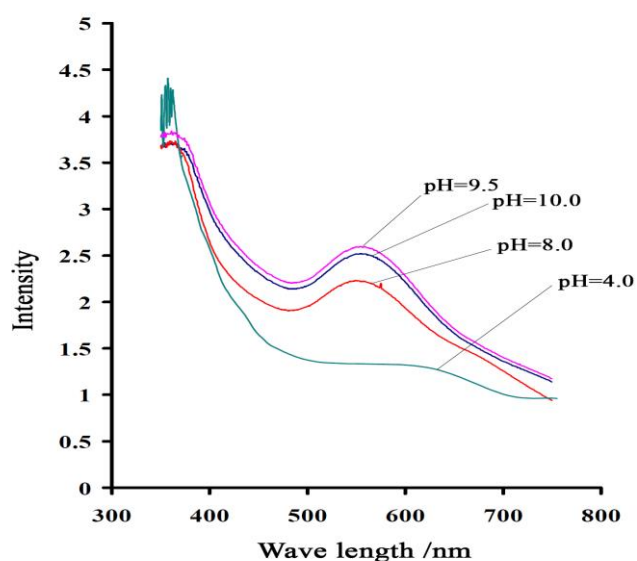
بررسی اثر pH بر بیوسنتز نانوذرات طلا

فاکتور مورد بررسی دیگر تأثیر تغییرات pH بر سنتز نانوذرات

طلا است. بررسی اثر پارامتر pH در سطوح ۴، ۸، ۹/۵ و ۱۰ مورد بررسی قرار گرفت. عموماً فعالیت اکسایش احیاء در شرایط بازی بهتر اتفاق می‌افتد. شکل ۵ نتایج به دست آمده از اثر pHهای مختلف در محدوده‌ی طول موج ۴۰۰-۸۰۰ را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به دست آمده pH برابر ۹/۵ به عنوان بهترین pH در دما و مدت زمان بهینه شده در آزمایشات قبلی مشخص گردید.



شکل ۴- بررسی اثر دما بر بیوسنتز نانوذرات طلا، در بازه‌ی ۲۲، ۳۵ و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد.



شکل ۵- بررسی اثر pH بر بیوسنتز نانوذرات طلا، در سطوح ۴، ۸، ۹/۵ و ۱۰.

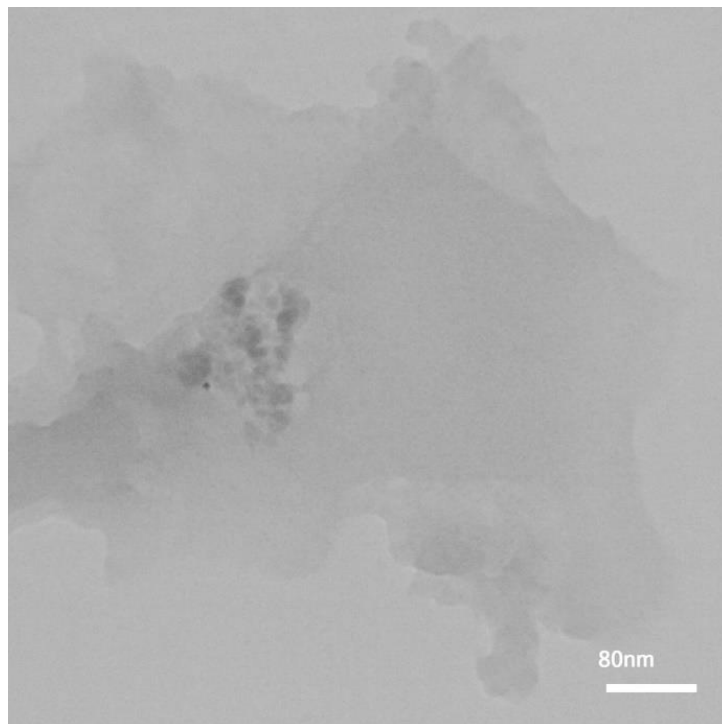
طیف (XRD) حاصل از نانوذرات طلا

دستگاه XRD فازهای بلورین موجود در مواد معدنی، فازهای متالورژی، سرامیکی و مواد با ارزش مثل گوهرها را شناسایی می‌کند [۱، ۴ و ۲۱]. برای بررسی صحت سنتز یک نانوذره پودری و تعیین اندازه‌ی آن تکنیک پراش پرتوی X یکی از پر قدرت‌ترین روش‌های مورد استفاده است. در پراش اشعه ایکس توسط کریستال مشاهده می‌شود که شدت اشعه ایکس بازتابیده از کریستال، که در هر اتم بصورت الاستیک پراکنده شده‌اند (بدون تغییر طول موج)، در زوایای خاصی ماکزیمم خواهد بود و در بقیه زوایا، شدت اشعه پراشیده شده مقدار قابل ملاحظه‌ای ندارد. نمودار بدست آمده شدت اشعه ایکس بازتابیده از نمونه را بصورت تابعی از زاویه نشان می‌دهد. توضیح این امر مربوط به خاصیت موجی اشعه ایکس و آرایش تناوبی کریستال می‌باشد [۱، ۲ و ۱۳]. طیف XRD نمونه بهینه شده در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳۰ دقیقه و pH مساوی ۹/۵ با ولتاژ دستگاه برابر ۴۰Kv و آمپراژ برابر ۳۰ آمپر تهیه گردید. طیف پراش پرتوی X نمونه مورد بررسی دارای ۴ پیک مربوط به نانوذرات طلا می‌باشد [۱۱، ۲۲ و ۲۳]. حضور پیک‌هایی از

اندیس میلر در موقعیت‌های ۳۶، ۴۱/۵، ۶۳ و ۷۷ که به ترتیب مربوط به لایه‌های (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰) و (۳۱۱) می‌باشد، تایید کننده سنتز صحیح نانوذرات طلا است.

نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

امروزه پیشرفت‌های موثری در سنتز نانوذرات حاصل شده است که به دلیل پیشرفت در روش مطالعه آنها می‌باشد. یکی از مواردی که در مطالعه نانوذرات نقش اساسی ایفا می‌کند، تعیین اندازه آنها می‌باشد. استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) یکی از روش‌های موثر در تعیین اندازه نانوذرات می‌باشد که می‌تواند اطلاعات کمی و کیفی مفیدی را در اختیار ما قرار دهد [۱۱، ۱۳ و ۲۴]. ساختار نانوذرات طلا بیوسنتز شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۶ نانوذرات طلا سنتز شده را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود نانوذرات طلا با ساختار تقریباً کروی و ستاره‌ای و با اندازه‌ای در گستره ۵ تا ۳۰ نانومتر سنتز شده است.



شکل ۶- عکس TEM نانوذرات طلا سنتز شده توسط عصاره بذر اسطوخودوس

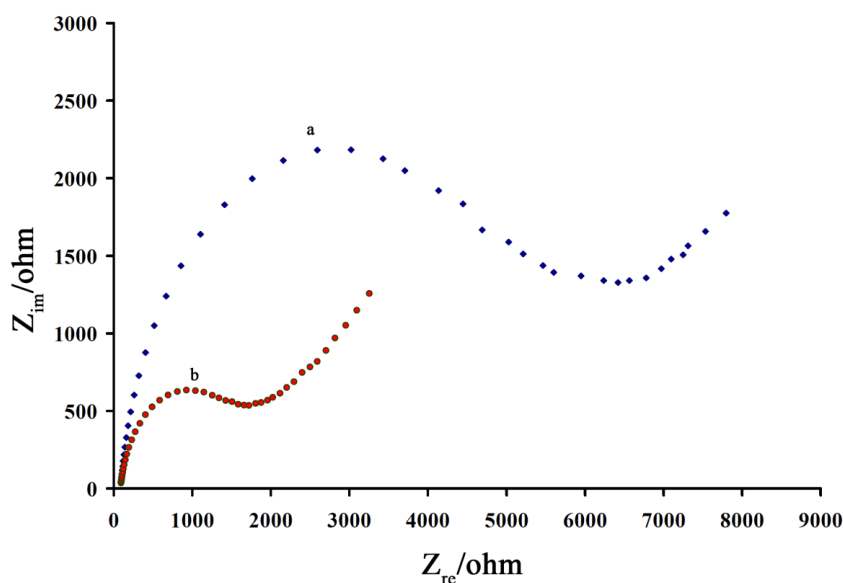
بررسی آمپدانس الکتروشیمیایی

برای بررسی تاثیر نانوذرات بر سیگنال‌های الکتریکی، از روش آمپدانس الکتروشیمیایی استفاده شد. شکل شماره ۷، طیف نایکوئیست ۰/۱ میلی مولار ترکیب فری سیانید پتاسیم (پتاسیم هگزاسیانوفرات) در سطح الکتروود خمیر کربن ساده (a) و خمیر کربن اصلاح شده با نانو ذرات طلا (b) را نشان می‌دهد. در حضور نانو ذرات طلا در سطح رسانا شعاع نیم دایره مربوط به طیف آمپدانس، کم شده که تاییدی بر کاهش مقاومت انتقال الکترون و رسانندگی نانو ذرات طلا است. نتایج به دست آمده در تحقیق مذکور با نتایج اسدی و باقی زاده و سالاری و همکاران مطابقت دارد [۴، ۱۱ و ۱۳].

نتیجه‌گیری

تهیه زیستی آسان نانو ذرات با کنترل اندازه و شکل در روش‌های ارائه شده از اهمیت فراوانی برخوردار است [۱، ۴ و ۲۵]. گیاهان زیادی وجود دارند که قابلیت ساخت نانو ذرات و استفاده در چنین صنعت ارزشمند و گران بهایی را دارند ولی هنوز ناشناخته باقی مانده‌اند [۱۳ و ۲۶]. فرآیند ساده احیای یون‌های فلزی و تولید نانو ذرات بوسیله متابولیت‌های اولیه و ثانویه‌ای مانند

آنتی‌اکسیدان‌ها، فلاونوئیدها، فلاون‌ها، ایزوفلاون‌ها، ایزوتیوسانات‌ها، کاروتنوئیدها و پلی‌فنول‌ها که در عصاره گیاهی وجود دارند صورت می‌گیرد. طبق نتایج بدست آمده، می‌توان گفت که گیاه دارویی اسطوخودوس قابلیت سنتز نانو ذرات طلا را دارا می‌باشد و با توجه به این که تاکنون استفاده از این گیاه به منظور کاهش زیستی یون‌های طلا گزارش نشده‌است، نتایج حاصل از این تحقیق کارکرد خوب این گیاه را برای اولین بار به وضوح نشان می‌دهد. در تحقیقاتی که داس و همکاران بر روی بیوسنتز نانو ذرات طلا بوسیله گیاه تاج خروس انجام داده‌اند، اندازه نانو ذرات در حدود ۷۰ تا ۱۰۰ نانومتر بوده‌است [۱۵ و ۱۹]. تعیین غلظت بهینه برای هر گیاه و هر نانوذره‌ای می‌تواند در تولید حداکثری و اقتصادی نانوذرات بسیار مفید باشد. علاوه بر این نوع ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاهی مختلف، بسته به نوع گیاه متفاوت می‌باشد و بدیهی است این موضوع باعث تغییر در شکل و خصوصاً میزان تولید نانوذرات می‌شود. فعالیت بهینه بیومولکول‌ها به شدت نسبت به pH محیط مجاور حساس است. گزارش شده است که pH محیط نقش بسیار موثری در کنترل اندازه ذرات ایفا می‌کند. نانو ذرات بزرگتر در pH پایین‌تر تشکیل می‌شوند. در pH اسیدی، تجمع نانو ذرات بزرگتر اطراف هسته جهت تکمیل



شکل ۷- منحنی نایکوئیست الکتروود خمیر کربن ساده (a) و الکتروود خمیر کربن اصلاح شده با نانوذرات طلا (b) در محلول ۰/۱ میلی مولار ترکیب فری سیانید پتاسیم

- Rapid Biosynthesis of Irregular Shaped Gold Nanoparticles from Macerated Aqueous Extracellular Dried Clove Buds (*Syzygium aromaticum*) Solution. *Colloids Surf., B*, 2010; 79(1):235-240.
- [8] Dinesh S, Karthikeyan S, Arumugam P. Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Glycyrrhiza glabra* Root Extract. *Arch Appl Sci Res*, 2012; 4(1):178-187.
- [9] Sneha K, Sathishkumar M, Lee SY, Bae MA, Yun YS. Biosynthesis of Au Nanoparticles using Cumin Seed Powder Extract. *J. Nanosci. Nanotechnol*, 2011;11 (2): 1811-1814.
- [10] Smitha S, Philip D, Gopchandran K. Green Synthesis of Gold Nanoparticles using *Cinnamomum zeylanicum* Leaf Broth. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009; 74(3):735-739.
- [11] Salari N, Baghizadeh A, Karimimaleh H, Asadi M. Biosynthesis of Gold Nanoparticles by Extract of Aerial Organs of Cumin (*Cuminum cyminum* L.). *Cellular. Molecular. Res.* 2019; 32(3): 286-296.
- [12] Li S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles using *Capsicum annum* L. Extract. *Green Chem*, 2007; 9(8): 852-858.
- [13] Asadi M, Baghizadeh A. Optimization and Characterization of Biosynthesized Gold Nanoparticles by *Oenothera biennis* Seed Extract using Taguchi Method. *J. Med. Plants*, 2020; 19 (75) :102-117.
- [14] Huang J. Biogenic Silver Nanoparticles by *Cacumen platycladi* Extract: Synthesis, Formation Mechanism, and Antibacterial Activity. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2011;50(15): 9095-9106.
- [15] Das RK, Borthakur BB, Bora U. Green Synthesis of Gold Nanoparticles using Ethanolic Leaf Extract of *Centella asiatica*. *Mater. Lett*, 2010; 64(13):1445-1447.
- [16] Kowshik K M, Deshmukh N, Vogel W, Urban J, Kulkarni S K, Paknikar K M. Microbial Synthesis of Semiconductor CdS Nanoparticles, Their Characterization, and Their Use in the Fabrication of an Ideal Diode. *Biotechnol. Bioeng.*, 2002; (78): 583-584.
- [17] Mubarakali D, Thajuddin N, Jeganathan K, Gunasekaran M. Plant Extract Mediated Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles and Its Antibacterial Activity Against Clinically Isolated Pathogens. *Colloids Surf., B*, 2011; 85(2):360-365.
- [18] Singaravelu G, Arocklamary S, Kumar V, Govindaraju K. A Novel Extracellular Synthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles using Marine Alga. *Colloids Surf., B*, 2007; (57): 97-101.
- نانوذره جدید اتفاق می افتد. در pH قلیایی، وجود تعداد زیادی از گروه‌های عملکردی برای باند شدن طلا یا نقره، موجب تشکیل تعداد زیادی از نانوذرات با قطر کوچک‌تر می‌شوند. [۱۱ و ۱۳].
- یکی از جنبه‌های مورد توجه در سنتز سبز نانوذرات، این است که فرآیند سنتز در دمای اتاق نیز اتفاق می‌افتد. با این حال، درجه حرارت محیط میانکنش، فاکتور بسیار مهمی در تعیین اندازه نانوذرات می‌باشد. دمای بهینه در تحقیق مذکور ۳۵ درجه سانتی‌گراد حاصل شد. هوانگ تشکیل نانوذرات نقره را با استفاده از عصاره برگ گیاه *Cacumen Platycadi* مطالعه کرد. نتایج این تحقیق نشان داد در دماهای بالا، درصد تشکیل نانو ذرات کروی با اندازه کوچک‌تر بطور قابل توجهی افزایش یافته در حالی که در دماهای پایین نانو ذرات با اندازه بزرگتر و مقیاس کمتری سنتز می‌شوند [۱۴]. کنترل اندازه نانو ذرات، تابع زمان واکنش نیز می‌باشد. نتایج تحقیق مذکور در مورد اثر زمان بر میزان تولید نانوذرات با نتایج بسیاری از محققین از جمله سالاری و همکاران تطابق کلی دارد [۱۱].

منابع

- [1] Nair R. Nanoparticulate Material Delivery to Plants. *Plant Sci*, 2010; 179(3):154-163.
- [2] Ahmad N, Bhatnagar S, Saxena R, Iqbal D, Ghosh AK, Dutta R. Biosynthesis and Characterization of Gold Nanoparticles: Kinetics, in vitro and in vivo Study. *Mater. sci. eng.* 2017; 78(1):553-564.
- [3] Maliszewska I, Aniszkiewicz L, Sadowski Z. Biological Synthesis of Gold Nanostructures using the Extract of *Trichoderma koningii*. *Acta Physica Polonica*, 2009; (116): 163-165.
- [4] Asadi M, Baghizadeh A. Biosynthesis, Optimization and Characterization of Gold Nanoparticles by *Hyoscyamus niger* Seed Extract using Taguchi Method. *Cellular. Molecular. Res* 2024; doi: 10.22034/cmr.2024.7535.2553.
- [5] Konishi Y, Nomura T, Tsukiyama T, Saitoh N. Microbial Preparation of Gold Nanoparticles by Anaerobic Bacterium. *Trans. Mater. Res*, 2004; (29):.2341-2343.
- [6] Aromal SA, Vidhu VK, Philip D. Green Synthesis of Well-dispersed Gold Nanoparticles using *Macrotyloma uniflorum*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2012; 85(1):99-104.
- [7] Raghunandan D, Bedre MD, Basavaraja S, Sawle B, Manjunath SY, Venkataraman A.

- [19] Das RK, Gogoi N, Babu PJ, Sharma P, Mahanta C, Bora U. The Synthesis of Gold Nanoparticles using *Amaranthus spinosus* Leaf Extract and Study of Their Optical Properties. *Adv. Mater. Phys. Chem*, 2012; 2(4):275-276.
- [20] Ankamwar B, Damle C, Ahmad A, Sastry M. Biosynthesis of Gold and Silver Nanoparticles using *Emblica officinalis* Fruit Extract, Their Phase Transfer and Transmetallation in an Organic Solution. *J. Nanosci. Nanotechnol*, 2005; 5(10):1665-1671.
- [21] Mohanpuria P, Rana N K, Yadav S K. Biosynthesis of Nanoparticles: Technological Concepts and Future Applications. *Nanopart . Res*, 2008; (10): 507-517.
- [22] Noruzi M, Zare D, Davoodi D. A Rapid Biosynthesis Route for The Preparation of Gold Nanoparticles by Aqueous Extract of Cypress Leaves at Room Temperature. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012; (94): 84-88.
- [23] Dubey SP, Lahtinen M, Sillanpää M. Tansy Fruit Mediated Greener Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles. *Process Biochem*, 2010; 45(7):1065-1071.
- [24] Fazaludeena MF, Manickamb C, Ashankyty IM, Ahmed MQ, Bege QZ. Synthesis and Characterizations of gGold Nanoparticles by *Justicia gendarussa* Leaf Extract. *J. Microbiol. Biotechnol. Res*, 2017; 2(1):23-34.
- [25] Prashant M, Nisha R, Sudesh K. Biosynthesis of Nanoparticles, Technological Concepts and Future Application, *Nanoparticle Res*, 2007; (21): 507-517.
- [26] Sarika S. Synthesis, Characterization and Antibacterial Potential of Silver Nanoparticles by *Morus nigra* Leaf Extract. *Indian J. Pharm. Biol. Res*, 2013; 1(4): 16-24.

مقاله پژوهشی

مقایسه اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمیوتیک، به صورت مستقیم و غیرمستقیم در نارسایی کلیوی القا شده با ایسکمی حاد قلبی در رت‌های نر نژاد ویستار

امیر اکبری آرمنده^۱، مهسا آل ابراهیم^{۲*}، نوشین باریک رو^۱، فاطمه روح الله^۱

^۱ گروه علوم سلولی و مولکولی، علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۲ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، واحد علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: mahsa.alebrahim@yahoo.com

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۳

چکیده

مقدمه: بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ایسکمی قلبی و همچنین نارسایی کلیوی متعاقب آن شیوع بسیار بالایی دارند و روش‌های درمانی موجود برای این بیماران، پرخطر و هزینه بر می‌باشند. دانشمندان با انتقال سلول‌های بنیادی مزانشیمی امیدوارند بتوانند بافت‌های مرده را جایگزین کرده و سبب فعالیت دوباره قسمت‌های آسیب‌دیده قلب و در نتیجه بافت کلیه گردند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش به بررسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمیوتیک با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری پرداخته شد. رت‌ها به ۳ گروه ۱۲ تایی، شامل نارسایی قلبی (HF) به عنوان گروه شاهد، HF+ hAMSCs تزریق به قلب و HF+ hAMSCs تزریق به کلیه، تقسیم شدند. سپس با روش بستن LAD، مدل ایسکمی حاد قلبی در رت‌ها ایجاد کرده و سلول‌ها به قلب آسیب‌دیده و بافت کلیه به طور جداگانه تزریق شدند، سپس بعد از ۲ روز و ۳۰ روز با استفاده از تکنیک ایمنوهیستوشیمی TNF- در بافت کلیه بررسی گردید و مقادیر سرمی اوره و کراتینین در روز ۲ و ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث: ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط فلوسایتومتری تایید گردید. سپس در فاز حیوانی اثرات سلول‌ها بر روی قلب و کلیه رت‌ها بررسی شدند، با توجه به نتایج تکنیک ایمنوهیستوشیمی، میزان بیان پروتئین TNF- در روز ۲، در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، اما اختلاف معناداری بین گروه‌ها وجود نداشت ($P > 0.05$) و در روز ۳۰، گروه تزریق سلول به کلیه نسبت به گروه کنترل کاهش معنا دار داشته است ($P < 0.05$). مقادیر سرمی اوره و کراتینین در روز ۲ بین گروه‌های درمانی و کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشده است ($p < 0.05$) و در روز ۳۰ بین گروه‌های تزریق سلول به کلیه و کنترل اختلاف معناداری وجود داشته است ($P < 0.05$). همان طور که انتظار می‌رود درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در روز ۲ پس از القای ایسکمی قلبی و آسیب کلیوی متعاقب آن، اثر درمانی معناداری نسبت

به گروه کنترل نداشته است، اما پس از ۳۰ روز گروه‌های درمانی به خصوص گروه تزریق سلول به کلیه، توانسته است سبب کاهش التهاب، بهبود ناحیه ی آسیب دیده و کاهش فیروز در بافت کلیه گردد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، غشای آمیوتیک، ایسکمی حاد قلبی، نارسایی کلیه، رت نر نژاد ویستار.

مقدمه

نارسایی قلبی پس از انفارکتوس قلبی اتفاق می‌افتد و می‌تواند به مرگ ناگهانی منجر شوند و در واقع هیچ دارویی برای درمان قطعی بیماری نارسایی قلبی وجود ندارد. انفارکتوس میوکارد موجب کاهش پیشرونده در عملکرد کلیه می‌شود؛ با این حال مطالعات کمی در مورد پاتوفیزیولوژی آن وجود دارد [۱]. انفارکتوس میوکارد فرآیندی است که در اثر توقف یا کاهش خون رسانی در عروق کرونر به دنبال انسداد یکی از شاخه‌های عروق کرونر و توقف ناگهانی جریان خون و کمبود اکسیژن به عضله قلب ایجاد می‌شود. انفارکتوس میوکارد یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تهدیدکننده زندگی است که ممکن است از طریق استرس اکسیداتیو و التهاب منجر به اختلالات کلیوی شود. به طور کلی، قلب و کلیه‌ها از نظر فیزیولوژیکی و هورمونی تعاملات پیچیده‌ای دارند. به عبارت دیگر، اختلال در عملکرد قلب بر کلیه‌ها و بالعکس تأثیر می‌گذارد. اختلال عملکرد در میان بیماران نارسایی قلبی شایع است و با افزایش بستری شدن در بیمارستان و مرگ و میر همراه است. به طور گسترده‌ای شناخته شده است که مکانیسم‌های کمک‌کننده به پاتورژن نارسایی قلبی شامل یک تعامل پیچیده دو طرفه بین کلیه و قلب است، همچنین محققان دریافته‌اند که بیماری حاد نارسایی قلبی می‌تواند باعث آسیب حاد کلیه شود همچنین نارسایی مزمن قلبی اغلب منجر به بیماری مزمن کلیه می‌شود [۲، ۳].

بیماران با نارسایی پیشرفته کلیه که تحت دیالیز (همودیالیز یا دیالیز صفاقی) قرار می‌گیرند، علیرغم بهبود توسط روش‌های تکنیکی و درمان آنمی با اریتروپویتین و کنترل وضعیت الکترولیتی بدن، همچنان در معرض بیماری‌های کاردیوواسکولر، نوروپاتی اتونوم و محیطی، بیماری‌های استخوان، اختلال در فعالیت‌های جنسی و ناتوانی در انجام فعالیت‌های روزانه خود هستند و برای بیشتر بیماران با نارسایی کلیه، پیوند کلیه بهترین و بزرگ‌ترین اقدام درمانی برای برگشت به زندگی عادی تلقی می‌شود [۴]. امروزه علوم مهندسی بافت برای درمان آسیب‌های

بافتی و انواع مختلفی از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی و کلیوی مورد توجه محققان قرار گرفته است. برای این منظور با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تحت تأثیر فاکتورهای مختلف رشد در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی، بدون وابستگی به بدن موجود زنده و به طور مستقل طراحی بافت انجام می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل خاصیت تمایز و تکثیر، منبع مناسبی برای بازسازی سلول‌های عضله قلب و همچنین کلیه می‌باشند. به نظر می‌رسد درمان به وسیله سلول‌های بنیادی یک سری فرآیندهای درونی بازسازی را فعال می‌کند که موجب تحریک بازسازی سلول‌ها می‌شوند [۵]. سلول‌های مزانشیمی جدا شده از غشاء آمیوتیک نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از دیگر منابع، قدرت تمایزی بیشتری دارند. شواهد نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از آمیوتیک مدت زمان کوتاه‌تری، برای بازسازی بافت در مقایسه با سلول بنیادی مزانشیمی جدا شده از منابع دیگر نیاز دارد [۶، ۷].

در این طرح از سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از غشاء آمیوتیک برای درمان آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی حاد قلبی به صورت غیر مستقیم (تزریق سلول به قلب) و به صورت مستقیم (تزریق سلول به کلیه) استفاده شد و اثرات سلول‌درمانی ایسکمی قلب بر روی کلیه رت‌ها از طریق بررسی سرمی کراتینین، اوره و بررسی پروتئین TNF- α بررسی گردید. مقادیر سرمی کراتینین، اوره و BUN محصولات جانبی متابولیسم عضله و شاخص عملکرد کلیه هستند. فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) یک سایتوکین التهابی است که نقش مهمی در پاتورژن عملکرد قلب و عروق و کلیه دارد. در جریان التهاب نیز، میانجی‌های مختلفی توسط سلول‌های سیستم ایمنی، همانند سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند TNF- α ترشح می‌شود که باعث تشدید پاسخ ایمنی می‌گردد [۸، ۹]. هدف از این مطالعه مقایسه‌ی اثرات درمانی استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمیوتیک به صورت مستقیم و غیر مستقیم در نارسایی کلیوی القا شده با ایسکمی حاد قلبی در رت‌های نر نژاد ویستار می‌باشد.

مواد و روش‌ها:**تهیه و تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشاء آمنیوتیک**

سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمنیوتیک از مرکز ملی ذخایر ژنتیک و زیستی ایران تهیه شدند. سلول‌ها جهت انجام کار آزمایشگاهی به آزمایشگاه مرکز تحقیقات ژنومیک پزشکی دانشگاه آزاد واحد علوم پزشکی انتقال یافتند. در محیط آزمایشگاه تا پاساژ ۷ کشت داده شدند. جهت تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جمله CD45 و CD34، CD73، CD90، CD105 توسط فلوسایتومتری بررسی شدند.

مدل حیوانی

تعداد ۴۰ سررت نر بالغ نژاد ویستار (Wistar) با محدوده وزنی ۳۵۰-۳۰۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شده و به اتاق حیوانات بیمارستان شهید رجایی تهران منتقل شدند. حیوانات در قفس‌های فایبرگلاس به ابعاد ۳۵×۳۰×۱۵ سانتی‌متر و تحت شرایط استاندارد با درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۶۰-۴۰ درصد نگه‌داری شدند.

گروه بندی و القای ایسکمی حاد قلبی

گروه ایسکمی: در این گروه نارسایی قلبی ایجاد شده و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر نمکی فسفات به عنوان حامل سلول (به تنهایی و بدون سلول) در محل ضایعه قلبی تزریق شد ($n=12$).

گروه ایسکمی + سلول تزریق به قلب: در این گروه نارسایی قلبی ایجاد شده و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر نمکی فسفات به عنوان حامل سلول به همراه سلول بنیادی مزانشیمی (تعداد دو میلیون سلول) در پاساژ ۵ به محل ضایعه قلبی تزریق شدند ($n=12$).

گروه ایسکمی + سلول تزریق به کلیه: در این گروه نارسایی قلبی ایجاد شده و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر نمکی فسفات به عنوان حامل سلول به همراه سلول بنیادی مزانشیمی (تعداد دو میلیون سلول) در پاساژ ۵ بدون به صورت مستقیم به بافت کلیه تزریق شدند ($n=12$).

ابتدا هر حیوان با تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین (۸۰ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و به حالت خوابیده به پشت بر روی تخت مخصوص جراحی رت تثبیت شدند. سپس موهای ناحیه سینه‌ای با تیغ اصلاح تراشیده شد. سپس با استفاده از اتوسکوپ شماره ۳ و آنژیوکت سبز حیوان اینتوبه و به دستگاه ونتیلاتور وصل شد. سپس قفسه سینه در فضای بین دنده‌ای سوم و چهارم با استفاده از قیچی به طول ۱۰ میلی‌متر برش داده شد. با این برش، رگ left anterior descending (LAD) به صورت یک spike ضربان‌دار قرمز روشن که در قسمت میانی دیواره قلب از زیر دهلیز چپ تا رأس قلب جریان دارد مشخص شد. رگ LAD به کمک نخ بخیه پلی پروپیلن ۰/۶ به اندازه ۲-۱ میلی‌متر پائین تر از نوک دهلیز چپ بسته شد و با زدن دو گره در این نقطه کاملاً مسدود شد. در نتیجه القاء ایسکمی با این روش، ایجاد ایسکمی در دیواره قدامی بطن چپ به صورت تغییر رنگ ناگهانی (بیرنگ شدن) می‌وکاردا تایید شد. بلافاصله بعد از ایجاد ایسکمی، درمان انجام شد. سپس لایه‌های عضلانی با استفاده از نخ بخیه پرولن ۰/۵ دوخته شد. و پوست حیوان با نخ بخیه نایلون ۰/۴ یا پرولن ۰/۳ بخیه زده شد.

سنجش فاکتورهای خونی

اوره و کراتینین فرآورده‌های جانبی زائد و حاصل سوخت و ساز در بدن هستند و چون فقط توسط کلیه‌ها دفع میشوند در واقع سطح خونی آنها معیار عملکرد نرمال کلیه‌ها می‌باشد. زمانی که به هر دلیلی در عملکرد کلیه‌ها اختلال ایجاد شود میزان کراتینین و اوره بعلت عملکرد ضعیف کلیه‌ها در تصفیه خون، افزایش می‌یابد. از این رو میتوان افزایش غیرعادی اوره و کراتینین را هشدار در مورد عملکرد ضعیف یا نارسایی کلیه دانست [۱۰].

تکنیک ایمونوهیستوشیمی

نمونه با (Sigma-PBS(P4417) در ۳ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شستشو داده شدند. سپس تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نفوذپذیر کردن غشاء سلول‌ها به نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها با PBS شستشو داده شدند و سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۴۵ دقیقه به منظور بلوک کردن واکنش آنتی‌بادی ثانویه به نمونه‌ها اضافه گردید. آنتی‌بادی اولیه رقیق شده ۱ به ۱۰۰ با PBS

مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، با تکنیک فلوسایتومتری بررسی شدند. با توجه به نتایج به دست آمده از بیان مارکرهای CD73, CD29, CD44, و CD105 که مثبت بوده و CD34 و CD45 که بیان منفی داشتند، نشان دهنده‌ی این است که سلول‌های استفاده شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده‌اند (شکل ۱).

نتایج بخش *in vivo*

نتایج بررسی بیوشیمیایی کراتینین و اوره سرم خون
آنالیز سطح سرمی کراتینین و اوره پس از ۲ و ۳۰ روز انجام گردید (شکل ۲)، با توجه به نتایج، میزان سطح کراتینین و اوره پس از ۲ روز در گروه درمانی با گروه کنترل، تفاوت معناداری نداشته است اما میزان سطح کراتینین و اوره ۳۰ روز پس از القای ایسکمی در گروه درمانی تزریق سلول به کلیه نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است ($P < 0.05$).

نتایج بررسی پروتئین TNF- با استفاده از ایمنوهایستوشیمی
بیان پروتئین TNF- در بافت کلیه در روز ۲ و روز ۳۰ توسط تکنیک ایمنوهایستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی میزان التهاب در گروه‌های درمانی تزریق سلول به قلب، گروه درمانی تزریق سلول به کلیه و گروه کنترل، پروتئین TNF- مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳).

بحث:

بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ایسکمی قلبی و همچنین نارسایی کلیوی متعاقب آن شیوع بسیار بالایی دارند و روش‌های درمانی مورد استفاده در این بیماران پرخطر و هزینه بر می‌باشند [۱۱]. از دست رفتن شدید عملکرد کلیه، چه به طور حاد و چه به طور مزمن، تهدیدی برای زندگی بوده و نیاز به خارج کردن فرآورده‌های زائد سمی و بازگرداندن حجم و ترکیب مایعات بدن به‌سوی میزان طبیعی دارد. در حال حاضر دو روش اصلی برای درمان نارسایی مورد استفاده قرار می‌گیرد: یک روش پیوند کلیه است که به علت تعداد کم اهدا کنندگان در مقابل تعداد متقاضیان محدود می‌شود، روش دیگر دیالیز است که آن نیز با

را بر روی نمونه‌ها ریخته و بعد از ایجاد یک محیط مرطوب برای جلوگیری از خشک شدن بافت به مدت ۲۴ ساعت درون یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت ظرف حاوی بافت از یخچال خارج و ۴ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شدند. سپس آنتی بادی ثانویه با رقت ۱ به ۱۵۰ اضافه و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه گردید. نمونه از انکوباتور به اتاق تاریک منتقل و بعد از ۳ بار شستشو، به آنها (DAPI (D9542- Sigma) اضافه گردید. پس از ۲۰ دقیقه نمونه با PBS شستشو داده شد. محلول گلیسرول و PBS را بر روی نمونه ریخته و لامل به منظور عکس‌برداری فلورسنت با میکروسکوپ (Olympus) برای تایید مارکرها قرار داده شدند.

ملاحظات اخلاقی

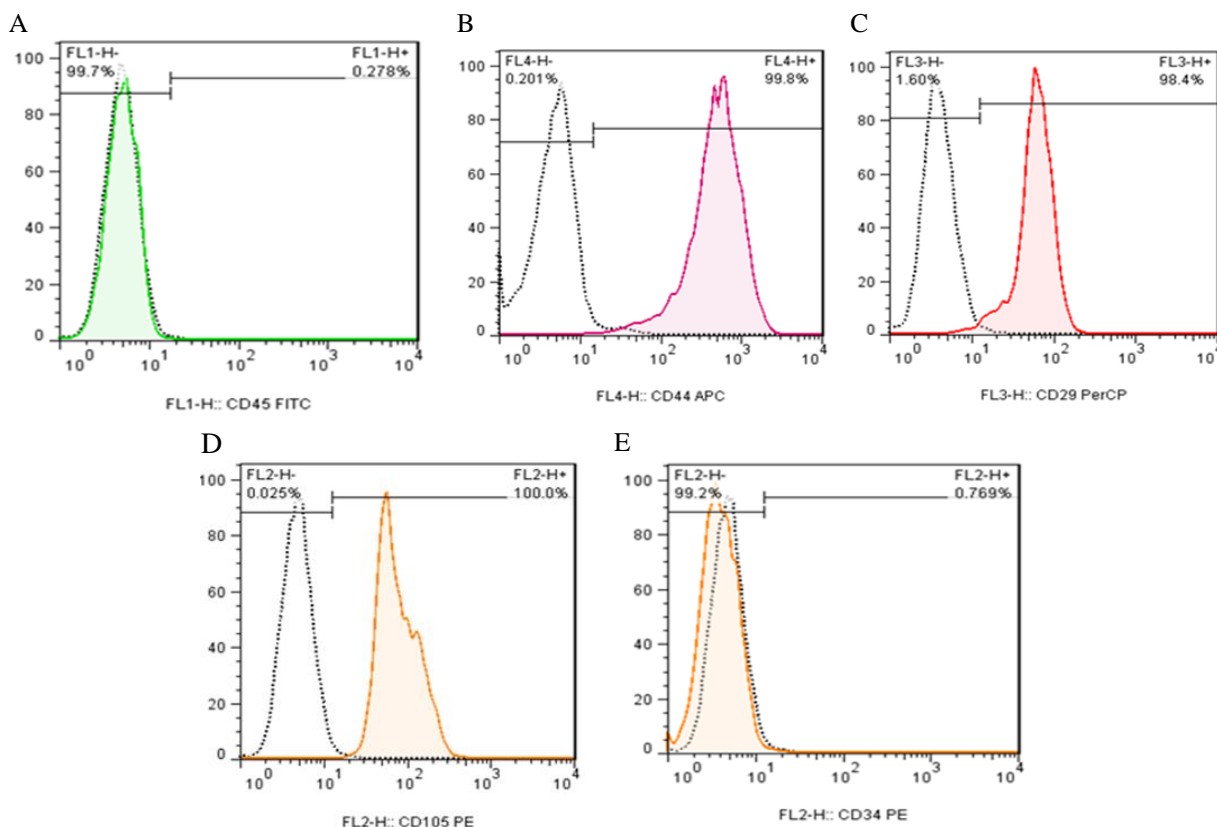
در تمام موارد، مسائل اخلاقی بر اساس استانداردهای کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران رعایت گردید و کد اخلاق دریافت گردید (IR.IAU.PS.REC). حیوانات طبق مقررات در حیوان‌خانه مرکز قلب و عروق شهید رجایی نگهداری شدند. همچنین حیوانات در حین کار کاملاً بی‌هوش می‌شدند تا دردی احساس نکنند. برای کاهش درد و عفونت بعد از جراحی از مرفین و پماد تتراسایکلین استفاده می‌شد. در حین عمل، چشم حیوان با پماد چشمی استریل ویتامین A مرطوب می‌گردید تا از خشکی و کدورت قرنیه بعد از عمل جلوگیری شود.

تحلیل آماری

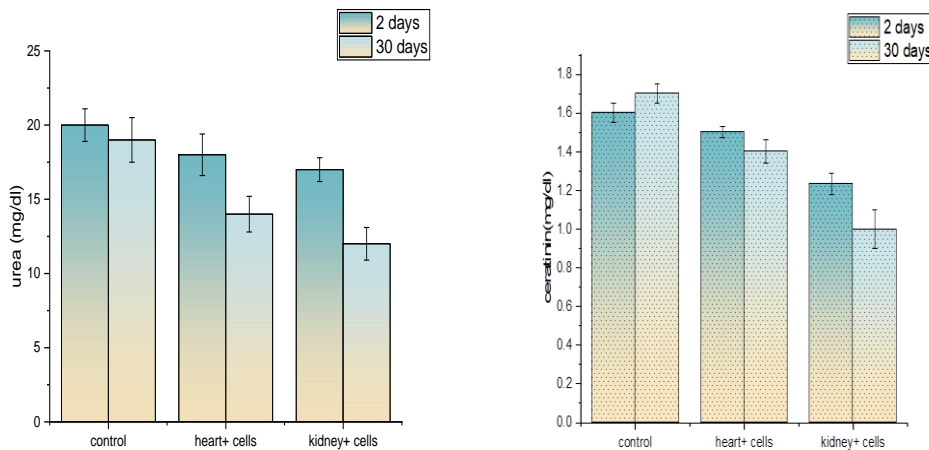
تمام آزمایشات حداقل با سه بار تکرار انجام شد و در این مطالعه برای توصیف داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. برای مقایسه میانگین دو گروه مستقل از آزمون T-test و برای مقایسه میانگین بیش از دو گروه از آزمون One-way ANOVA استفاده گردید و نتایج به صورت $p\text{-value} < 0.05$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شدند.

نتایج بخش *in vitro*

بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

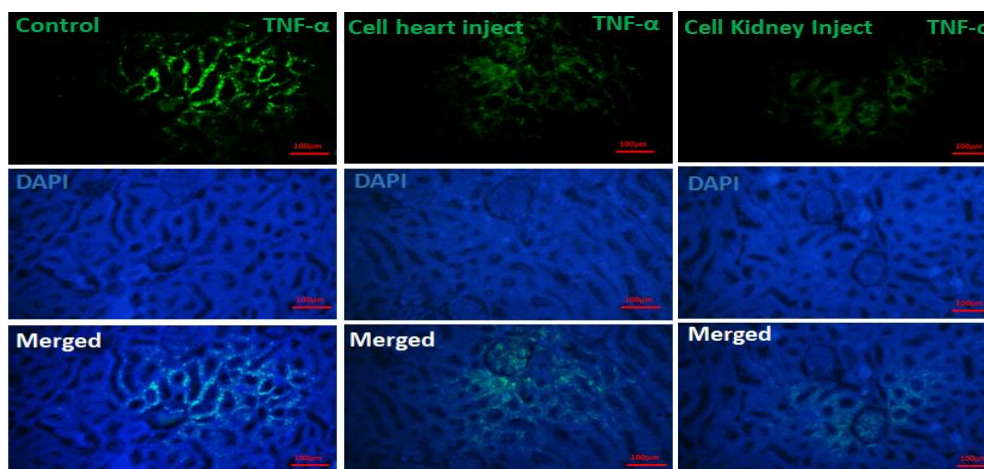


شکل ۱- بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمیوبلاستیک، با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری: هیستوگرام (A) بیان آنتی‌ژن CD45 = ۰/۲۷٪، هیستوگرام (B) بیان آنتی‌ژن CD44 = ۹۹/۸٪، هیستوگرام (C) CD29 = ۹۸/۴٪، هیستوگرام (D) بیان آنتی‌ژن CD105 = ۱۰۰٪، هیستوگرام (E) بیان آنتی‌ژن CD34 = ۰/۷۶٪، باتوجه به نمودارهای فوق، سلول‌های استفاده شده در این طرح، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند.

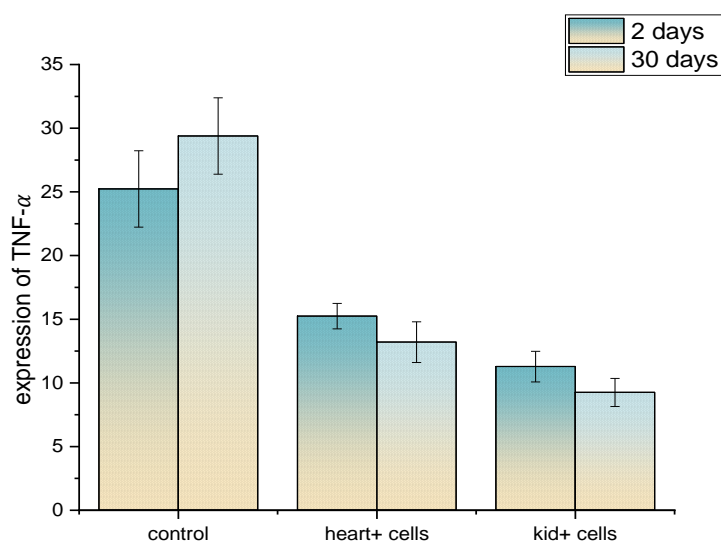
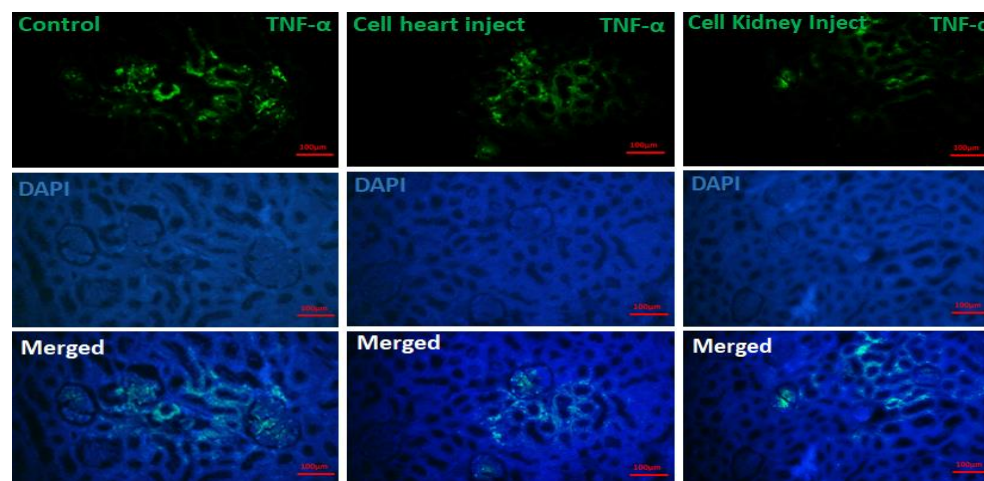


شکل ۲- اندازه‌گیری اوره سرم در روز ۲ پس از القای ایسکمی قلبی و ایجاد نارسایی کلیوی و درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بین گروه‌های درمانی و کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشده است ($p > 0.05$). اندازه‌گیری اوره سرم در روز ۳۰ پس از القای ایسکمی قلبی بین گروه‌های تزریق سلول به کلیه و کنترل اختلاف معناداری وجود داشته است ($p < 0.05$). اندازه‌گیری کراتینین سرم در روز ۲ پس از القای ایسکمی قلبی و ایجاد نارسایی کلیوی و درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بین گروه‌های درمانی و کنترل اختلاف معناداری مشاهده نشده است ($p < 0.05$). اندازه‌گیری کراتینین سرم در روز ۳۰ پس از القای ایسکمی قلبی و ایجاد نارسایی کلیوی و درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بین گروه‌های تزریق سلول به کلیه و کنترل، اختلاف معناداری وجود داشته است ($p < 0.001$). بین گروه تزریق سلول به کلیه و کلیه در روز ۳۰ اختلاف معناداری وجود داشته است ($p < 0.05$).

A



B



شکل ۳- نتایج تکنیک ایمونوهیستوشیمی، A- بررسی بیان TNF- α پس از ۲ روز، در گروه‌های کنترل، گروه‌های تزریق سلول به قلب، گروه‌های تزریق سلول به کلیه. با توجه به نتایج تکنیک ایمونوهیستوشیمی، میزان بیان پروتئین TNF- α در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، اما اختلاف معناداری بین گروه‌ها وجود نداشت ($P>0.05$). B- بررسی بیان TNF- α پس از ۳۰ روز، در گروه‌های کنترل، گروه‌های تزریق سلول به قلب، گروه‌های تزریق سلول به کلیه. با توجه به نتایج تکنیک ایمونوهیستوشیمی، میزان بیان پروتئین TNF- α در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. گروه تزریق سلول به کلیه نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشته است (* $P<0.05$). Scale bar = 100 μ m.

ایزوپرنالین بر عملکرد کلیه پرداختند که با اندازه‌گیری سطح سرمی کراتینین و بررسی پروتئین $TNF-\alpha$ توسط ایمونوهیستوشیمی، شاهد بروز آسیب و کاهش عملکرد کلیوی بودند و مشاهده کردند که ایسکمی قلبی اثر منفی مستقیم بر کلیه دارد و می‌تواند موجب بروز نارسایی کلیه شود [۹].

Srikanth Yandrapalli و همکاران در سال ۲۰۲۲ به بررسی آسیب حاد و مزمن کلیوی، که به دنبال انفارکتوس حاد میوکارد بوجود می‌آید، پرداختند. تفاوت‌ها را در گروه‌های بیماران بدون آسیب کلیوی پس از انفارکتوس میوکارد، تجزیه و تحلیل کردند. در نتیجه، از هر ۴ بازمانده انفارکتوس میوکارد، ۱ نفر نارسایی حاد یا مزمن کلیوی داشت. وجود هر شکلی از نارسایی کلیوی باعث افزایش قابل توجهی در بستری شدن و مرگ و میر بیماران قلبی دارد [۲۰].

با توجه به نتایج مطالعه‌ی فوق که در جهت نتیجه‌ی طرح حاضر بوده، ایسکمی قلبی می‌تواند سبب بروز آسیب کلیوی گردد که در این طرح به درمان آن توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرداخته شد.

در طرح حاضر پس از تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط تکنیک فلوسایتومتری و تمایز این سلول‌ها به سلول‌های استخوان و چربی در قسمت *IN VIVO*، از این سلول‌ها جهت درمان آسیب‌های کلیوی ناشی از ایسکمی قلبی حاد در رت‌ها استفاده شد. با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی میزان بیان پروتئین $TNF-\alpha$ و همچنین مقادیر سرمی اوره و کراتینین در روز ۲ و ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت.

در راستای این تحقیقات Yubo Peng و همکاران در سال ۲۰۲۰ به مطالعه‌ی اثرات درمانی دوزهای متفاوت نیترات بر آسیب کلیه متعاقب از نارسایی قلبی پرداختند. آن‌ها مشاهده کردند که نفوذ سلول‌های التهابی به سلول‌های بینابینی و اطراف آن و گلوومرول کلیوی و نکروز توبولار در تمام گروه‌های درمانی به درجات مختلف کاهش یافت و نتیجه گرفتند که بهبود سلول‌های عضله‌ی قلب می‌تواند سبب بهبود عملکرد کلیه شود [۲۱].

با توجه به نتایج تکنیک ایمونوهیستوشیمی، میزان بیان پروتئین $TNF-\alpha$ ، ۲ روز پس از شروع درمان در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، اما اختلاف معناداری

محدودیت‌هایی همراه است [۲]. وجود چنین محدودیت‌هایی در درمان نارسایی‌های کلیوی منجر به جست و جوی روش‌های درمانی دیگر شده است. استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان نارسایی کلیوی در جانوران مدل، نتایج امیدوار کننده‌ای به دنبال داشته‌اند. در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به نقش تعدیل‌کننده سیستم ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های چند ظرفیتی هستند که به انواع مختلفی از سلول‌ها مانند استخوان، بافت چربی، استروما تبدیل می‌شوند و نیز باعث تعدیل پاسخ‌های ایمنی می‌گردند [۱۲-۱۵].

MSCها بر انواع سلول‌های ایمنی بدن نظیر لنفوسیت‌های T، لنفوسیت‌های B، سلول‌های کشنده‌ی طبیعی (NK) و سلول‌های دندریتیک اثر مهاری داشته و در نهایت سبب کاهش و تنظیم پاسخ‌های ایمنی می‌شوند. علاوه بر این، MSCها بیان MHC کلاس II، CD11، CD83 و مولکول‌های کمک محرک را بر سطح مونوسیت‌ها کاهش می‌دهند. بنابراین MSCها باعث کاهش سایتوکین‌های پیش التهابی از جمله $TNF-\alpha$ و $IL-12$ می‌شوند [۱۶]. در حالی که ایسکمی قلبی رخ می‌دهد فاکتورهای $NFK-\beta$ در ناحیه‌ی آسیب دیده‌ی قلبی و همچنین کلیه (به دلیل وارد شدن آسیب متعاقب از ایسکمی قلبی) افزایش می‌یابد، افزایش مسیر سیگنالینگ استرس اکسیداتیو که باعث افزایش افزایش $NFK-\beta$ شده و افزایش این ژن در هسته سبب بیان ژن‌های التهابی دیگر نظیر $TNF-\alpha$ می‌شود، زمانی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به ناحیه‌ی ایسکمی قلبی تزریق می‌شوند می‌توانند سبب مهار $NFK-\beta$ و کاهش $TNF-\alpha$ شوند. در نتیجه می‌توانند باعث کاهش التهاب و بهبود در کلیه‌ی آسیب دیده شوند [۱۷، ۱۸].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق فعال کردن همین مسیر AKT می‌توانند سبب افزایش مهاجرت سلولی به ناحیه ایسکمی قلبی شده و با فعال کردن مسیر AKT/PI3K می‌توانند سبب تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به VEGF شود و از همین طریق باعث بهبود عملکرد قلب شده و از طریق افزایش خون‌رسانی و ترشح یک سری بیومولکول‌ها و سایتوکین‌ها می‌توانند باعث بهبود کلیه‌ی آسیب دیده شوند [۱۷، ۱۹].

Mohammad Maram Ghartavol و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی اثر ایسکمی قلبی ایجاد شده در رت توسط

Reference:

- [1] Mokhtari B, Aboutaleb N, Nazarinia D, Nikougoftar M, Razavi Tousi SMT, Molazem M, et al. Comparison of the effects of intramyocardial and intravenous injections of human mesenchymal stem cells on cardiac regeneration after heart failure. *Iran J Basic Med Sci.* 2020; 23(7): 879-85.
- [2] Zakeri R, Burnett JC, Jr., Sangaralingham SJ. Urinary C-type natriuretic peptide: an emerging biomarker for heart failure and renal remodeling. *Clin Chim Acta.* 2015;443:108-13.
- [3] Sávio-Silva C, Soinski-Sousa PE, Balby-Rocha MTA, Lira AdO, Rangel ÉB. Mesenchymal stem cell therapy in acute kidney injury (AKI): review and perspectives. 2020.
- [4] Missoum A. Recent Updates on Mesenchymal Stem Cell Based Therapy for Acute Renal Failure. 2020.
- [5] Dergilev KV, Shevchenko EK, Tsokolaeva ZI, Beloglazova IB, Zubkova ES, Boldyreva MA, et al. Cell Sheet Comprised of Mesenchymal Stromal Cells Overexpressing Stem Cell Factor Promotes Epicardium Activation and Heart Function Improvement in a Rat Model of Myocardium Infarction. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(24).
- [6] Jiao H, Shi K, Zhang W, Yang L, Yang L, Guan F, et al. Therapeutic potential of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells in APP transgenic mice. *Oncol Lett.* 2016; 12(3):1877-83.
- [7] Ra K, Oh HJ, Kim EY, Kang SK, Ra JC, Kim EH, et al. Comparison of Anti-Oxidative Effect of Human Adipose- and Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium on Mouse Preimplantation Embryo Development. *Antioxidants (Basel).* 2021; 10(2).
- [8] Deicher A, Seeger T. Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Disease Model System for Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2021;18(1):1-11.
- [9] Ghartavol MM, Gholizadeh-Ghaleh Aziz S, Babaei G, Hossein Farjah G, Hassan Khadem Ansari M. The protective impact of betaine on the tissue structure and renal function in isoproterenol-induced myocardial infarction in rat. *Mol Genet Genomic Med.* 2019; 7(4): e00579.
- [10] Hafazeh L, Changizi-Ashtiyani S, Ghasemi F, Najafi H, Babaei S, Haghverdi F. Stem Cell Therapy Ameliorates Ischemia-reperfusion Induced Kidney Injury After 24 Hours Reperfusion. 2019.

بین گروه‌ها وجود نداشت ($P > 0.05$). همچنین بررسی بیان $TNF-\alpha$ پس از ۳۰ روز، میزان بیان پروتئین $TNF-\alpha$ در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. گروه تزریق سلول به کلیه نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشته است ($P < 0.05$). همان‌طور که انتظار می‌رود سلول‌های بنیادی مزانشیمی بتوانند سبب مهار $NFK-\beta$ و کاهش $TNF-\alpha$ در بافت‌های تزریق شده شوند؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه‌های درمانی تزریق سلول به قلب و کلیه توانسته‌اند سبب کاهش فاکتور $TNF-\alpha$ گردند، که گروه تزریق سلول به کلیه نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشته است و سبب کاهش التهاب شده‌اند.

نتایج اندازه‌گیری اوره و کراتینین سرم، در روز ۲ پس از القای ایسکمی قلبی و ایجاد نارسایی کلیوی و درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نشان می‌دهد که بین گروه‌های درمانی و کنترل اختلاف معناداری وجود نداشته است ($p > 0.05$) و اندازه‌گیری اوره و کراتینین سرم، در روز ۳۰ پس از القای ایسکمی قلبی بین گروه‌های تزریق سلول به کلیه و کنترل اختلاف معناداری وجود داشته است ($p < 0.05$). همان‌طور که فرض می‌شد تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت مستقیم به بافت کلیه بتواند اثر درمانی بیشتری در بافت کلیه آسیب دیده داشته باشد، نتایج بررسی اوره و کراتینین سرم، در تایید فرضیه فوق می‌باشد، در گروه‌های درمانی تزریق مستقیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی به بافت کلیه، میزان اوره و کراتینین کاهش معنادار پیدا کرده است.

نتیجه‌گیری:

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل خاصیت تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی، عدم رد پیوند در میزبان و هم‌چنین به دلیل داشتن خاصیت خودنوزایی و تمایز می‌توانند منبع مناسبی برای سلول‌درمانی و درمان نارسایی کلیه باشند، همچنین مقدار مناسب جهت تزریق سلول‌ها به قلب و کلیه رت‌ها، ۲ میلیون سلول بود و بهترین زمان تزریق سلول‌ها، بلافاصله پس از ایجاد ایسکمی می‌باشد.

- [11] Ou H, Teng H, Qin Y, Luo X, Yang P, Zhang W, et al. Extracellular vesicles derived from microRNA-150-5p-overexpressing mesenchymal stem cells protect rat hearts against ischemia/reperfusion. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12(13): 12669-83.
- [12] Chen L, Qu J, Xiang C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther*. 2019; 10(1):1.
- [13] Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant*. 2015; 24(3): 339-47.
- [14] Steichen C, Erpicum P. Combining cell-based therapy and normothermic machine perfusion for kidney graft conditioning has gone one step further. 2021.
- [15] Huang J, Kong Y, Xie C, Zhou L. Stem/progenitor cell in kidney: characteristics, homing, coordination, and maintenance. 2021.
- [16] Bai M, Zhang L, Fu B, Bai J, Zhang Y, Cai G. IL-17A improves the efficacy of mesenchymal stem cells in ischemic-reperfusion renal injury by increasing Treg percentages by the COX-2/PGE2 pathway. 2018 (93): 814-25.
- [17] Zhang J, McCullough PA. Lipoic Acid in the Prevention of Acute Kidney Injury. 2016.
- [18] Grange C, Skovronova R, Marabese F, Bussolati B. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Kidney Regeneration. 2019.
- [19] Shukla A, Choudhury S, Chaudhary G, Singh V, Prabhu SN, Pandey S, et al. Chitosan and gelatin biopolymer supplemented with mesenchymal stem cells (Velgraft(R)) enhanced wound healing in goats (*Capra hircus*): Involvement of VEGF, TGF and CD31. *J Tissue Viability*. 2021; 30(1): 59-66.
- [20] Yandrapalli S, Christy J, Malik A, Wats K, Harikrishnan P, Aronow W, et al. Impact of Acute and Chronic Kidney Disease on Heart Failure Hospitalizations After Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*. 2022; 165: 1-11.
- [21] Peng Y, Li Y, Chen M, Song J, Jiang Z, Shi S. High-dose nitrate therapy recovers the expression of subtypes $\alpha 1$ and β adrenoceptors and Ang II receptors of the renal cortex in rats with myocardial infarction-induced heart failures. 2020.

Comparison of the therapeutic effects of amniotic membrane mesenchymal stem cells, directly and indirectly, in renal failure induced by acute cardiac ischemia in male Wistar rats

Akbari Armand A.¹, Ale-Ebrahim M.^{2*}, Barikrow N.¹, Rohollah F.¹

¹ Department of Molecular and Cellular Sciences, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

^{2*} Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

* (Corresponding author): mahsa.alebrahim@yahoo.com

Received: August 2024

Accepted: December 2024

Abstract

Cardiac ischemia and subsequent renal failure are very common. The researchers found that with the transfer of stem cells, dead tissues can be replaced and cause the damaged parts of the heart and thus the kidney tissue to function again. Materials and methods: Mesenchymal stem cells (MSCs) of amniotic membrane were analyzed by flow cytometry. The rats were divided into 3 groups of 12, including heart failure (HF) as a control, HF+ hAMSCs injected into the heart, and HF+ hAMSCs injected into the kidney. Then, with LAD closure method, an acute cardiac ischemia model was created in rats and cells were injected into the damaged heart and kidney tissue separately, after 2 and 30 days using immunohistochemistry, TNF- α in kidney tissue and urea and creatinine serum levels was investigated. Results and discussion: the effects of the cells on the heart and kidneys of rats were investigated, according to the immunohistochemical results, the level of TNF- α protein expression was significantly decreased on day 30, in the group of cells injected into the kidney compared to the control ($P < 0.05$). There was a significant difference in the serum urea and creatinine values between the kidney cell injection and control on day 30 ($P < 0.05$). Treatment with MSCs on the 2nd day after the induction of cardiac ischemia and subsequent kidney damage did not have a significant therapeutic effect compared to the control, but on the 30th day, the treatment groups, especially the kidney cell injection group, were able to reduce inflammation, improve the damaged area and decrease Fibrosis in kidney tissue.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Amniotic Membrane, Acute cardiac ischemia, male Wistar rats.

Biosynthesis, optimization and characterization of gold nanoparticles by lavender seed extract

Baghizadeh A.^{1*}, Zareie Dehseraji S.², Karimi - Maleh H.³, Ebrahimi M.⁴

^{1*} Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman-Iran

² M.Sc. Agricultural Biotechnology, Payame Noor University

³ Department of Chemical Engineering, Laboratory of Nanotechnology, Quchan University of Technology, Quchan, Iran

⁴ Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran

* (Corresponding author): amin_4156@yahoo.com

Received: June.2024

Accepted: December 2024

Abstract

The tendency to produce and use nanoparticles is increasing due to their characteristics in medicine and industry. Today, metal nanoparticles, especially gold nanoparticles, are widely used in the fields of cancer treatment, pharmaceuticals, targeted transfer of biological compounds, production of cosmetics and many other industries. Among the methods of producing nanoparticles in the right size and amount, the cost-effective and biocompatible method of using plant tissues has attracted the attention of scientists. In this research, lavender seed extract was prepared by soaking in heat, and then by combining the extract with gold nitrate and diluting with deionized water, gold nanoparticles were produced. The factors affecting the production process of nanoparticles, including time, temperature and pH, were also determined by visible-ultraviolet absorption spectroscopic analysis, checking and optimal synthesis conditions, pH = 9.5, temperature 35 degrees Celsius and time 30 minutes. The results showed that with increasing temperature and time, the size and synthesis rate of nanoparticles increases and no nanoparticles were synthesized at acidic pH. Then, using x-ray diffraction and transmission electron microscopy techniques, the size and structure of the produced nanoparticles were investigated. The results showed that the produced gold nanoparticles have a crystalline structure and are spherical and homogeneous with an average diameter of 50 nm. The Nyquist curve of simple carbon paste electrode and carbon paste modified with gold nanoparticles confirmed the electrical conductivity of gold nanoparticles and their presence in lavender seed extract.

Keywords: Biosynthesis, Nanobiotechnology, *Lavandula angustifolia*, Seed extract, Gold nanoparticles.

The combined cytotoxic effect of capecitabine and melatonin on HER2-positive (SK-BR3) and HER2 negative (MCF-7) cell lines of human breast cancer and measurement of superoxide dismutase enzyme activity

Shayan S.¹, Takbiri Osgoei L.^{2*}, Javani Jouni F.³

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

^{2*} Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Department of Biochemistry and biophysics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* (Corresponding author): layatakбири536@gmail.com

Received: December 2023

Accepted: January 2024

Abstract

Breast cancer is one of the most common cancers diagnosed in women. Melatonin is a natural indole amine synthesized in the pineal gland. A large number of studies show that melatonin can be an attractive candidate for combination therapy due to its antioxidant and cytotoxic activities. It was hypothesized that melatonin in combination with capecitabine may show a synergistic effect on MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cell lines.

To investigate the effect of the above medicines on the level of superoxide dismutase enzyme activity, It was performed alone and in combination, on cell lines. The results showed that in both cell lines, the combined use of two medicines led to a greater increase in the activity of the superoxide dismutase enzyme. The synergistic property of these two compounds is clearly evident in the results of the superoxide dismutase enzyme. The combined use of these two compounds leads to a reduction in the dose of capecitabine. Which will result in reducing the side effects of this medicine.

Keywords: Melatonin, capecitabine, breast cancer, MCF7, SK-BR-3, superoxide dismutase.

Investigation of Sphingosine and Ceramide Level Changes in Oligozoospermia Samples among Infertile Men

Akbari A., Ghasemian F. *

Department of Biology, Faculty of sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

* (Corresponding author): ghasemian@guilan.ac.ir

Received: July 2024

Accepted: September 2024

Abstract

Background: Oligozoospermia is one of the causes of infertility in men, characterized by a low sperm count compared to normozoospermia according to World Health Organization criteria. Sphingolipids are crucial regulators of many cellular processes, such as cell differentiation and apoptosis. The most important sphingolipid metabolites include ceramides and sphingosine, where an imbalance in ceramide levels can lead to apoptosis. This study aims to investigate the changes in various types of ceramides and sphingosine in oligozoospermia samples from infertile men.

Materials and Methods: In this study, semen samples were collected from couples visiting the Alzahra Infertility Treatment Center in Rasht (n=10). The samples were analyzed based on World Health Organization parameters, and oligozoospermia (sperm count less than 15 million per milliliter of semen) and normozoospermia groups were included in the study. The levels of various ceramides (Cer14, Cer16, Cer18, and Cer20) and sphingosine were measured using high-performance liquid chromatography.

Results: The findings showed a significant difference in the level of sphingosine in the oligozoospermia group compared to the normozoospermia group ($p < 0.05$). Additionally, the levels of various ceramides were significantly increased in the oligozoospermia group compared to the control group ($p < 0.0001$).

Conclusion: Overall, the results indicate that sphingolipid metabolites play a crucial role in the quantity of spermatogenesis, and alterations in these metabolites can lead to reduced fertility in men. Therefore, these metabolites can serve as good criteria for fertility assessments and pharmaceutical targets.

Keywords: Sperm, Male infertility, Ceramide, Sphingosine, HPLC.

Review of leather production processes based on mycelium of fungus

Sadeghi Amjad Sh.¹, Dadgostar H.², Laripour M.^{3*}

¹ PhD student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² PhD student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

^{3*} Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* (Corresponding author): m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

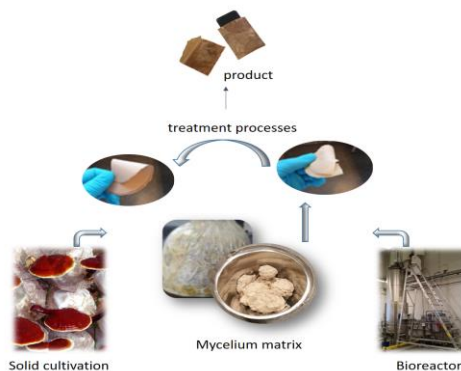
Received: July 2024

Accepted: September 2024

Abstract

With the increasing global development of biotechnology and the increase in population, humans have always sought to reduce the damage caused to the environment by their lives, fungi and plants are the most suitable options for the production and biological development of sustainable materials. Being renewable, having high safety for the environment, being cheap, being biodegradable and being native biological materials is an important milestone in the bioengineering of materials. transform them into substrates with high strength and high pressure tolerance, different species of filamentous fungi and mushroom are involved in the leather production process based on the mentioned function. Their mass production during cultivation (in three methods, solid cultivation, liquid and submerged fermentation), separation of the resulting biomass during special processes, drying, final shaping and replacement of the resulting composition in the leather industry can be effective in reducing a large part of the damage caused to the environment.

Keywords: leather, fungi, Mycelium-based leather, biological matrix.



Graphical abstract

Investigation of the reparative effects of rosmarinic acid on experimental spinal cord injury in the Wistar rat animal model

Emadi S. A.¹, Naddaf H.², Hoveizi E.^{3*}

¹ Student, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

^{3*} Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

* (Corresponding author): e.hoveizi@scu.ac.ir

Received: March 2024

Accepted: August 2024

Abstract

Spinal cord injury is a condition in which the spinal cord's parenchyma is damaged due to trauma or different diseases. Inflammatory reactions can indeed play a significant role in causing spinal cord injuries by altering the function of cells and leading to the death of nerve cells. Rosmarinic acid, a water-soluble polyphenolic phytochemical, possesses antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic properties. In this study, 12 Wistar rats were divided in two groups with equal populations. The control group did not receive any treatment after spinal cord injury until day 56, while the rosmarinic acid group received 100 mg/kg of rosmarinic acid extract in their drinking water daily until day 56 after the spinal cord injury. During the 56-day period, the mice were assessed for movement using the Basso, Beattie, and Bresnahan test. The group treated with rosmarinic acid showed higher scores in terms of movement recovery compared to the control group. The examination of tissue sections revealed that the group treated with rosmarinic acid exhibited significantly better recovery and repair, a reduction in the size of complications, and an increase in the myelination of nerve fibers at the spinal cord injury site compared to the control group ($p < 0.005$). The research findings suggest that rosmarinic acid could potentially be a valuable therapeutic option for treating spinal injuries in the future. It's exciting to see the potential restorative effects of this compound in experimental studies on rats. This could pave the way for further exploration and development of new treatment options for spinal injuries.

Keywords: spinal cord injury, rosmarinic acid, neuroprotection, inflammation, animal model.

Understanding the Different pathways of programmed cell death in the targeted therapy of diseases

Arasteh A.^{1*}, Karimpour M.¹, Fallah F.², Kiani S.²

^{1*} Department of biology, Rasht branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

² Department of biology, Central Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* (Corresponding author): arasteh@iau.ac.ir

Received: April 2024

Accepted: September 2024

Abstract

Developing therapies that promote the efficient death of cancer cells by apoptosis has been a cornerstone and goal of clinical oncology for over thirty years. Multiple signaling pathways, known as intrinsic and extrinsic, are involved in the process of programmed cell death. These pathways are activated by various stimuli such as immune surveillance, DNA damage and cellular stress. Cell death may also be influenced by how apoptotic pathways interact with other signaling processes. Drug discovery studies (Addressing bioavailability, stability, tumor penetration, toxicity profile in non-malignant tissues, drug interactions, and off-target effects) and an understanding of tumor biology are essential for the clinical translation of effective pro-apoptotic agents. Tumor cell death is possible with therapeutic methods, but the selection, growth and proliferation of resistant cells ultimately determine the lethality potential. The present study aimed to investigate the early apoptosis pathways and the related signaling pathways, along with discussing their molecular targets in terms of therapy.

Keywords: Apoptosis, Signaling pathways, Caspase, Cancer.

Quarterly Journal of Developmental Biology

Vol. 16, No. 4, Autumn 2024

Title	Page
Understanding the Different pathways of programmed cell death in the targeted therapy of diseases Arasteh A., Karimpour M., Fallah F., Kiani S.	1
Investigation of the reparative effects of rosmarinic acid on experimental spinal cord injury in the Wistar rat animal model Emadi S. A., Naddaf H., Hoveizi E.	13
Review of leather production processes based on mycelium of fungus Sadeghi Amjad Sh., Dadgostar H., Laripour M.	23
Investigation of Sphingosine and Ceramide Level Changes in Oligozoospermia Samples among Infertile Men Akbari A., Ghasemian F.	37
The combined cytotoxic effect of capecitabine and melatonin on HER2-positive (SK-BR3) and HER2 negative (MCF-7) cell lines of human breast cancer and measurement of superoxide dismutase enzyme activity Shayan S., Takbiri Osgoei L., Javani Jouni F.	45
Biosynthesis, optimization and characterization of gold nanoparticles by lavender seed extract Baghizadeh A., Zareie Dehseraji S., Karimi - Maleh H., Ebrahimi M.	53
Comparison of the therapeutic effects of amniotic membrane mesenchymal stem cells, directly and indirectly, in renal failure induced by acute cardiac ischemia in male Wistar rats Akbari Armand A., Ale-Ebrahim M., Barikrow N., Rohollah F.	63
Abstracts	1-7

In The Name of God

Journal of Developmental Biology

Vol. 16, No. 4, Autumn 2024

License Holder: Islamic Azad University – North Tehran Branch (Research Deputy)

Editor-in-Chief: Majd A, PhD

Director-in-Charge: Arbabian S, PhD

Managing Director: Tajadod G, PhD

Editorial Board :

Majd A., PhD	Professor, Islamic Azad University, North Tehran Branch
Nabiuni M., PhD	Associate Professor, Kharazmi University
Parivar k., PhD	Professor, Islamic Azad University, Science and Research Branch
Rezanejad F., PhD	Associate Professor, Shahid Bahonar University of Kerman
Mehrabian S., PhD	Professor, Islamic Azad University, North Tehran Branch
Syedena Y., PhD	Associate Professor, Shahid Beheshti University, Tehran
Rahnama M., PhD	Associate Professor, Islamic Azad University, Zanjan Branch
Arbabian S., PhD	Associate Professor, Islamic Azad University, North Tehran Branch
Iranbakhsh A. R., PhD	Professor, Islamic Azad University, Science and Research Branch
Hamdi S.M.M. , phd	Associate professor, Islamic Azad University, Central Tehran Branch

Editors:

Prof. A. Majd

Prof. S. Arbabian

Prof. G. Tajadod

Designer:

Dr. S. Arbabian

Address: Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tenth Boston Alley, Makran Jonubi St, Heravi Sq, Tehran, Iran.

P. C. No: 1667914161

Tel: +98 21 22949792