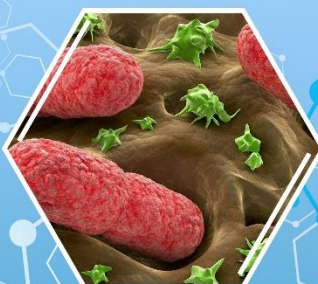




# مجله علمی رهیافت های نوین در علوم سلولی و مولکولی

New approaches in Cellular and Molecular Sciences



## فهرست

جداسازی سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم به متی‌سیلین حاوی ژن *arcA* تولیدکننده  
انتروتوکسین‌های A، B، C، D، E، I و G از عفونت‌های بیمارستانی در اصفهان، ایران  
پریسا بهشود\*<sup>۱</sup>..... ۳

## lncRNAها در بیماری مولتیپل اسکلروزیس

نسرین نصیری\*<sup>۱</sup>، زهرا زمانزاده<sup>۲</sup>، آیدا مهدی‌پور<sup>۳</sup>، آرین مهدی‌پور<sup>۴</sup>..... ۱۸

## کلونینگ و آنالیز فیلوژنتیکی ژن *gag* ویروس نقص ایمنی گاوی در جدایه‌های ایرانی

الهه تاج بخش..... ۲۸

## شکلات‌های آنتی بیوتیکی هاریتاکی چورنا روشی شیرین تر برای درمان کودکان

Sukanya Jitendra Patil<sup>\*1</sup>, Rushikesh Shivaji Hingmire<sup>2</sup>, Sneha Shrikant Kavitate<sup>3</sup>, Pranali  
Manohar Pinage<sup>4</sup>, Priyanka Dinkar Hankare<sup>5</sup>..... ۴۰

## مروری بر انواع روش‌های تهیه کیتوسان

شهریار صالحی..... ۶۲

## افزایش بیان همزمان PVT1 و MYC در بافت توموری پستان بیماران ایرانی: شواهد تقویت‌شده‌ای از ارتباط lncRNAها با انکوژن‌های مجاور

یوسف رضا رضایی ملک<sup>۱</sup>، محمد شفیعی<sup>۲</sup>، رضا طبری پور..... ۷۲



# رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۳ شماره ۱ بهار ۱۴۰۴

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



**جداسازی سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس مقاوم به متی‌سیلین حاوی ژن *arcA* تولیدکننده انتروتوکسین‌های A, B, C, D, E, G و I از عفونت‌های بیمارستانی در اصفهان، ایران**  
پریسا بهشود  
گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

## اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۶

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۰

چاپ: بهار ۱۴۰۴

DOI:

[doi.org/10.82415/NACMS.2025.1207939](https://doi.org/10.82415/NACMS.2025.1207939)

کلمات کلیدی:

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، انتروتوکسین، مقاومت به متی‌سیلین.

## چکیده

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس انواع مختلفی از سموم پروتئینی خارج سلولی از جمله انتروتوکسین‌های استافیلوکوکی را تولید می‌کند که به عنوان سوپرانتی‌ژن عمل می‌کنند و می‌توانند شرایطی را برای حمله به سلول‌های میزبان فراهم کنند. هدف از مطالعه حاضر، تعیین الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی و شناسایی ژن‌های انتروتوکسین شایع در سویه‌های MRSE حاوی ژن ACME-*arcA* در اصفهان بود. این بررسی بر روی ۱۵۰ ایزوله استافیلوکوکی به‌دست‌آمده از عفونت‌های مختلف بیمارستانی انجام شد. سویه‌های MRSE با روش PCR جداسازی شدند. الگوهای ضد میکروبی ایزوله‌های MRSE با روش انتشار دیسک تعیین شد. در نهایت، ژن‌های انتروتوکسین در سویه‌های MRSE حاوی ژن ACME-*arcA* با استفاده از سیستم PCR شناسایی شدند.

از ۱۵۰ عفونت بالینی، ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس جداسازی شد. از بین ۱۰۰ سویه استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، ۶۵ (جدا به) ۶۵٪ MRSE (بودند. از این تعداد، ۳۳ جدا به) ۵۰،۷٪) هر دو ژن *mecA* و ACME-*arcA* را داشتند. الگوهای ضد میکروبی جدا به‌های MRSE در این مطالعه نشان داد که جدا به‌های MRSE بالاترین میزان مقاومت را به اریترومايسين (۸۱،۵٪) و کلیندامایسین (۶۴،۶٪) نشان دادند، در حالی که کمترین مقاومت را به ریفا مپیسین (۷،۶٪) و لینزولید (۱،۵٪) نشان دادند. علاوه بر این، فراوانی ژن‌های انتروتوکسین *sec*، *seb*، *sea*، *sei* و *seh* به ترتیب ۶۰،۶٪، ۶۳،۶٪، ۱۵،۱٪، ۶۶،۶٪، ۲۲،۷٪ و ۷۵،۷٪ در جدا به‌های حاوی ژن‌های *mecA* و ACME-*arcA* گزارش شد. تنوع انواع ژن‌های انتروتوکسین و شاخص مقاومت در بین ACME-*arcA* کدکننده MRSE، باعث نگرانی در مورد سلامت عمومی شده است؛ بنابراین گزارش سریع و دقیق وجود ژن‌های انتروتوکسین از عفونت‌های بیمارستانی ضروری است.

\* نویسنده مسئول: [parisa\\_behshood@yahoo.com](mailto:parisa_behshood@yahoo.com)

## INTRODUCTION

In the recent two decades, the importance of coagulase-negative staphylococci has raised. *Staphylococcus epidermidis* is the most important member of the coagulase-negative staphylococci (CoNS), and have been connected to significant hospital-associated infections (HAI) which today is resistant to methicillin (1). More than 70% of the hospital isolates are methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), which makes it difficult, and costly to treat. MRSE is one of the most important bacteria that cause such complications as bacteremia, endocarditis, wound infection, urinary tract infections, pneumonia, and skin, and soft tissue infections, particularly in the intensive care unit (ICU). These bacteria are considered as the third cause of hospital infection (2, 3).

The emergence of antibiotic-resistant MRSE strains in hospital environments might cause serious problems to hospitalized patients, especially in immunocompromised patients. This phenomenon ultimately leads to high mortality rates among patients in hospital environments (4-6). *Staphylococcus epidermidis* containing the ACME-*arcA* reserves are closely correlated with pathogens, and antimicrobial-resistant genes (7). ACME is a genetic region of the DNA integrated inside the *orfX*. This element adheres to the SCC*mec* element in MRSEs, and enhances the pathogenicity, and colonization of MRSEs in humans. However, the agent entry of this element into SCC*mec* has not yet been known (4, 8). ACME is in the downstream region of the

staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), and together make up the ACME-SCC*mec*. It seems the physical interactions between SCC*mec*, and ACME appear to increase antibiotic resistance, and pathogenicity in staphylococci (7, 8). Today, the infectious transmitted diseases in hospitals pose a major global problem, some of which are transmitted through contaminated foods in hospital (4, 8). Food poisoning occurs as a result of eating foods that contain heat-resistant enterotoxins, and are usually produced by staphylococci. These toxins are injected into the circulatory system, then affecting the incontinent vomiting center to produce such symptoms as nausea, vomiting, rarely diarrhea, and abdominal muscle pains (7-9).

Enterotoxins are transmitted horizontally through mobile genetic elements (MGEs) such as transposons, bacteriophages, conjugative plasmids, and pathogenicity islands (PAIs). They inflict serious dangers, particularly to the elderly, immunocompromised *individuals*, pregnant women, and infants. Staphylococcal enterotoxins in the group of superantigens (SAGs) have 23 different types. Depending on the type of enterotoxin, the amount of produced toxins ranges from 10 ng to 20 µg (7, 9, 11). Enterotoxins are similar in structure, and biological activity but differences in antigenic properties. More than 95% of the food poisoning enterotoxins produced by the *Staphylococcus epidermidis* are part of the A-E groups. In addition, enterotoxin to being the basic reason for

food poisoning, the main impression in pathological activities, such as osteomyelitis, sepsis, and respiratory distress syndrome (11,13, 28).

*Staphylococcus enterotoxins* can tolerate 100°C for half an hour. Their thermal resistance in food is higher than that in the laboratory cultures, so their biological activity remains unchanged after the heating stages of food preparation. Moreover, these toxins *gastric resistance* to acid, and activity remained even after food digestion.

Although pasteurization might destroy staphylococcal cells, the heat-resistant staphylococci enterotoxins remains biologically strenuous. Therefore, these toxins should be considered as important factors of food poisoning (10, 12, 13). All enterotoxins are mitogens of T cells that cause non-specific proliferation of T cells, and can provide conditions *to attack host cells*; even 0.1mg of enterotoxins can stimulate T cells, and cause digestive disorders without damaging the intestinal tissue (10, 12, 14). The present study was designed, and implemented for the isolation ,and detection of *sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, and sei* genes in *mecA*, and *ACME-arcA* positive strains isolated from hospital infections.

## Materials and Methods

### Strain isolation and identification

This cross-sectional study was done, during a period of 6 months in 2020. On a total of 150 staphylococcal isolates acquired from different nosocomial infections such as urine, blood,

wound, catheter, throat in hospitals of Isfahan (Shariati, Gharazi, and Mehregan hospitals). Samples were incubated at 37 °C for 24 hours in blood agar (Merck, Germany). After colony growth, complementary tests based on using conventional bacteriological methods such as gram staining, culture on *mannitol salt agar* (MSA) (Merck, Germany), other biochemical tests such as coagulase, and novobiocin sensitivity assay were performed (15).

### Detection of *mecA* genes by Polymerase Chain Reaction

The PCR method was used to detect MRSE isolates according to a described protocol in Hoveida et al (16). All DNA of strains was extracted, utilizing a DNA extraction kit (CinnaGen, Iran). The amplification reaction was performed in a final volume of 25 µl, containing 5 µl of genomic DNA, and 12.5 µL of Taq DNA polymerase, PCR master mix contained 2.5 µl 10x buffer, 0.6 µl MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µl dNTP, 0.5 µl of each primer (10 pmol/ µl), and 15.2 µl ddH<sub>2</sub>O. A total of 35 cycles were performed with an initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 15s, annealing at 55°C for 15s, and extension at 72°C for 20s, followed by a final extension at 72°C for 5 min. The *PCR products* were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel, stained with *SYBR Green*. The primer sequence used in this reaction is shown in Table1.

### Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility patterns of MRSE strains were done according to disk diffusion procedure (Kirby–Bauer). For this purpose, antibiotics including erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), cefoxitin (30 µg), tetracycline (30 µg), gentamicin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), cotrimoxazole (25 µg), rifampicin (5 µg), linezolid (30 µg) (*Mast, UK*) have been used (14). After 24h of incubation, the diameter of zone of inhibition of bacterial growth was measured, and results compared to the reference tables prepared by CLSI (15).

#### Screening of ACME-*arcA* gene

Identification of the ACME-*arcA* gene in the MRSE isolates was done using a thermal cycle, and specific primers for this gene. The primer sequence, and PCR condition are shown in Table1 (7). Briefly, all DNA of strains was extracted, utilizing a DNA extraction kit (CinnaGen, Iran). The amplification reaction was performed in a final volume was adjusted to 25 µl, containing 1 µl of genomic DNA, and 12.5 µL of Taq DNA polymerase, PCR master mix (CinnaGen, Iran), 1 µl of each primer, and 15.2 µl ddH<sub>2</sub>O. A total of 35 cycles were performed with an initial denaturation at 96°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 45min, annealing at 45.5°C for 60 min, and extension at 72°C for 1min, followed by a final extension at 72°C for 10 min. The *amplification products* were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel, stained with SYBR Green (7).

#### Detection of enterotoxin genes

To detection of enterotoxin genes, DNA of each isolate was extracted, utilizing a DNA extraction kit (CinnaGen, Iran) according to the manufacturer's instructions.

The DNA concentration, and purity was confirmed using Nanodrop a 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). PCR specific primers, and conditions utilized to sequence genomic DNA was shown in Table 1.

#### Statistical Analysis

All analyses were carry outed using SPSS Statistics version 20 (SPSS, Chicago, USA), using chi-square test, and kappa coefficient and values < 0.05 were considered statistically significant.

#### RESULTS

Out of 150 nosocomial infections, 100 *Staphylococcus epidermidis* strains were isolated. Among the 100 of *Staphylococcus epidermidis* recovered from nosocomial infections, 65 isolates (65%) were found resistant to methicillin (MRSE) (Figure1(A)), and of these, 33 isolates (50.76%) had both *mecA*, and ACME-*arcA* genes (Figure1(B)). The antimicrobial susceptibility patterns of MRSE isolates in this study showed that the MRSE isolates exhibited the highest rates of resistance to erythromycin (81.5%), clindamycin (64.6%), cefoxitin (63.07%), and tetracycline (61.5%), while they showed the lowest resistance to rifampicin (7.6%), and linezolid (1.5%) (Table 2). The antimicrobial resistance patterns of various types of hospital infections against commonly [utilized](#)

antibacterial agents is shown in Table 3. Also, the frequencies of *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, and *sei* genes were 60.6% (20 strains), 63.6% (21 strains), 66.6% (22 strains), 15.1 % (5 strains), 6% (2 strains), 72.7% (24 strains), 0% (0 strains), and 75.7% (25 strains) respectively, in the

isolates containing the *mecA*, and ACME-*arcA* genes. Figure 1 shows the patterns according to the primers utilization in the PCR test. The *sei* gene isolated from urine infection that showed the highest ratio between enterotoxin genes (Figure 2).

Table 1: Primer sequence used in the PCR reaction

Gene	Amplicon size	Sequence	Annealing temperature	Reference
<i>mec</i>	310 bp	F:TGGCTATCGTGTCAACAATCG R:CTGGAACCTTGTTGAGCAGAG	55°C	(16)
<i>arcA</i>	486 bp	F: GAG CCA GAA GTA CGC R: CAC GTA ACT TGC TAG AAC GA	45.5°C	(7)
<i>sea</i>	120bp	F: CCTTTGGAAACGGTTAAAACG R: TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	55°C	(16)
<i>seb</i>	164bp	F: GTATGGTGGTGTAACTGAGC R:CCAAATAGTGACGAGTTAGG	50°C	(32)
<i>sec</i>	257 bp	F: GCAGGTACTCTATAAGTGCC R:GACATAAAAGCTAGGAATTT	50°C	(33)
<i>sed</i>	278bp	F: CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG R: ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	50°C	(32)
<i>see</i>	170bp	F:CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGG CCAC R: CTTACCGCCAAAGCTG	55°C	(31)
<i>seg</i>	287 bp	F: TGCTCAACCCCGATCCTAAATTAGACGA R: CCTCTTCCTTCAACAGGTGGAGACG	55°C	(17)
<i>seh</i>	376 bp	F:CAATCACATCATATGCGAAAGCAG R:CATCTACCCAAACATTAGCACC	50°C	(31)
<i>sei</i>	454 bp	F: TGGAGGGGCGCACTTTATCAGGA R: TCCATATTCTTTGCCTTTACCAGTG	50°C	(17)

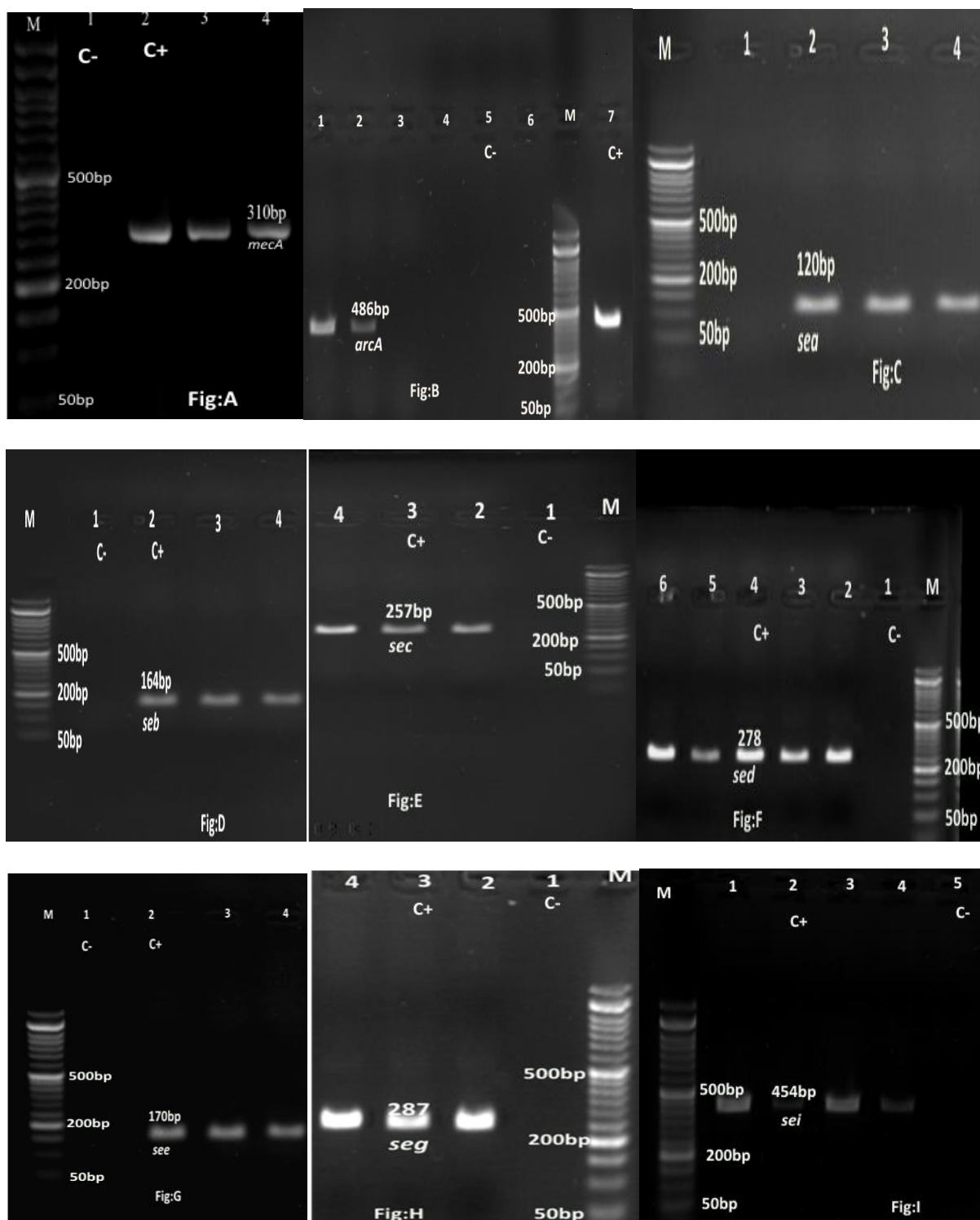


Figure (1).Electrophoresis gel images of *mecA* (A), *arcA* (B), *sea* (C), *seb* (D), *sec* (E), *sed* (F), *see* (G), *seg* (H), and *sei* (I) genes. In each image, C+: positive control, C-: negative control, and M: marker ladder



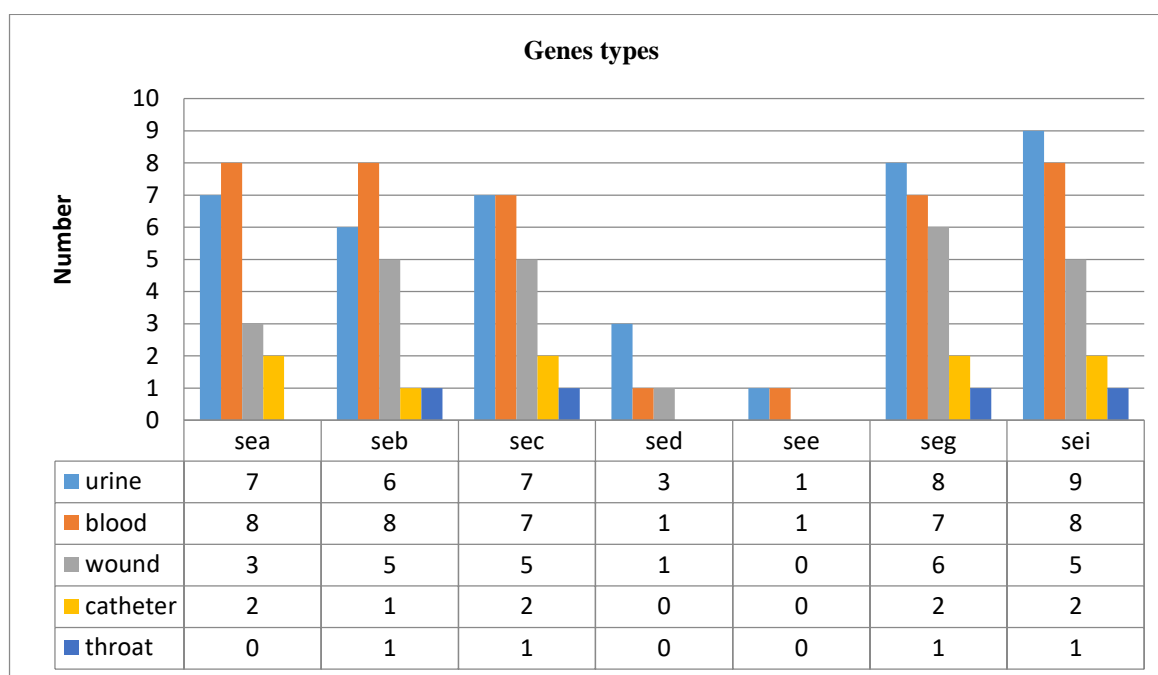
Table 2: Antibiotic susceptibility patterns of MRSE isolates

Antibiotic	No. of strains	Resistance (%)	No. of strains	semi resistance (%)	No. of strains	Sensitivity (%)
erythromycin	53	81.5	7	10.7	5	7.6
clindamycin	42	64.6	21	32.3	3	4.6
cefoxitin	41	63.07	20	30.7	4	6.1
tetracyclin	40	61.5	19	29.2	6	9.2
gentamicin	39	60	21	32.3	5	7.6
cotrimoxazole	38	58.4	20	30.7	7	10.7
ciprofloxacin	30	46.1	23	35.3	12	18.4
rifampicin	5	7.6	-	-	60	92.3
linezolid	1	1.5	4	6.1	60	92.3

Table 3. Antimicrobial resistance patterns of various types of hospital infections against commonly [utilized](#) antibiotics

Antimicrobial Agents	Types of Infections					
	Urine	Blood	Wound	Catheter	Throat	Total
	(28)	(18)	(12)	(5)	(2)	(65)
erythromycin	24 (85.7%)	17 (94.4%)	8 (66.6%)	3 (60%)	1 (50%)	53 (81.5%)
clindamycin	20 (71.4%)	11 (61.1%)	8 (66.6%)	3 (60%)	-	42 (64.6%)
cefoxitin	13 (46.4%)	14 (77.7%)	11 (91.6%)	2 (40%)	1 (50%)	41 (63.07%)
tetracyclin	21 (75%)	8 (44.4%)	9 (75%)	2 (40%)	-	40 (61.5%)

<b>gentamicin</b>	17 (60.7%)	9 (50%)	10 (83.3%)	3 (60%)	-	39 (60%)
<b>cotrimoxazole</b>	11 (39.2%)	13 (72.2%)	9 (75%)	4 (80%)	1 (50%)	38 (58.4%)
<b>ciprofloxacin</b>	14 (50%)	8 (44.4%)	5 (41.6%)	3 (60%)	-	30 (46.1%)
<b>rifampicin</b>	1 (3.5%)	3 (16.6%)	1 (8.3%)	-	-	5 (7.6%)
<b>linezolid</b>	-	1 (5.5%)	-	-	-	1 (1.5%)



Figure(2). Distribution of enterotoxin genes between methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains gathered from different hospital infections

## DISCUSSION

It has been more than two decades since coagulase-negative staphylococci have emerged as opportunistic pathogens. The use of embedded medical devices (e.g. various types of prostheses,

and catheters) over the past decades has made methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* an important pathogen in the hospital. The global studies showed that 60–85% of clinical

*Staphylococcus epidermidis* isolates are resistant to methicillin (18,19, 20).

In our study, we found that 65 *Staphylococcus epidermidis* strains out of 100 strains (65%) were MRSE. According to the outcomes of the studies systematic review, and meta-analysis by Razavi et al in 2018, MRSE had a higher diffusion level in Isfahan, Tabriz, Sanandaj, and Arak than Tehran, because of in Tehran better MRSE infection controlled (19). Also, the obtained results by Razavi et al. indicating that the level of MRSE infections was higher in the western departments of Iran than the other departments (19, 20). In the study of Xu et al. in the community of Shanghai area of China in 2018, the prevalence of *Staphylococcus epidermidis*, and MRSE in healthcare personnel were reported to be 61.3%, and 30% respectively (21). According to Shamansouri et al. (2016) in Isfahan, the frequency of *mecA* in clinical isolates were reported to be 56.41% (7). Clearly, the abundance of MRSE isolates in these three studies was consistent with our findings. In this study, the methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolates exhibited the highest resistance to erythromycin (81.5%), clindamycin (64.6%), cefoxitin (63.07%), and tetracycline (61.5%), while they showed the lowest resistance to rifampicin (7.6%), and linezolid (1.5%). Here, the highest resistance to erythromycin is consistent with those reported for the hospitals in Tehran, Tabriz, and Isfahan (2, 22, 23).

According to the results of the current, and similar previous studies across Iran, we can

conclude that the antibiotics linezolid and, daptomycin can be effectively used in the therapy of infections due to MRSE (5). In our study, we found that from 65 *Staphylococcus epidermidis* isolates, 33 isolates (50.76%) had ACME-*arcA* genes. In the study of Diep et al. the spread of ACME-*arcA* was presented 60% (25). In a survey conducted by Shamansouri et al. (2016) in Isfahan, ACME-*arcA* was reported in 14 (20.58%) of MRSE isolates, and they reported that the ACME-*arcA* gene was able to promote the increase, maintenance, and diffusion of strains with multiple-drug resistance (7).

In the study of Xu et al. in the community of Shanghai area of China in 2018, the prevalence of ACME-*arcA* was reported in 67.7% of MRSE isolates, and 74.1 of *Staphylococcus epidermidis* strains, and 83.3% of Methicillin-sensitive *Staphylococcus epidermidis* (MSSE) isolates (21). The result of this study was almost close to ours. Granslo et al. (2010) observed that 40% of the *Staphylococcus epidermidis* isolates extracted from contaminated blood cultures contained the ACME gene (26). Miragaia et al. (2009) found that 51% of the *Staphylococcus epidermidis* in the world areas were the ACME positive (27, 7). the results of this study are in agreement with our research.

Food poisoning is a foodborne illness. *Staphylococcus epidermidis* in nosocomial infection produce toxins called enterotoxins that are a cause of food poisoning agents. Previous studies have shown patients carriers enterotoxin can be a source of infection in the community,

especially in hospitals. PCR analysis conducted, in the present study, revealed that the frequencies of *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, and *sei* genes were 60.6% (20 strains), 63.6% (21 strains), 66.6% (22 strains), 15.1 % (5 strains), 6 % (2 strains), 72.7% (24 strains), 0% (0 strains), and 75.7% (25 strains) respectively, in the isolates.

According to Pereira et al. (2017) *Staphylococcus epidermidis* had a high prevalence of superantigenic genes in coagulase-negative staphylococci that cause severe infections. In this study, the frequency of *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *she*, and *sei* genes were 69.8%, 64.3%, 69.5%, 71.4%, 50%, 69.7%, 61.5%, and 72% respectively (28). The result of this study was almost close.

The *sea* gene is carried by a prophage that facilitates its diffusion among staphylococcal strains, and its product is enterotoxin A, as one of the major food poisoning toxins (28). Many studies have shown that these genes are predominant in CoNS (29).

Vasconcelos et al. (2011) showed that the most common enterotoxin genes were *seg*, and *sei* staphylococci, with a frequency of 62.7%, and 66.7%, respectively (30). These genes exist in the *egc* cluster, which also includes genes encoding other staphylococcal enterotoxins, and these genes have shown to be highly correlated with each other. The result of this study was similar to ours.

Differences between the results of different studies may be attributed to differences in the method used, and in the samples studied,

including the number, environment, and geographical source of the samples (29).

Pinheiro et al. (2015) detected enterotoxin genes in 95.3% of the blood cultures infected with *Staphylococcus epidermidis* isolates, and that had at least one enterotoxin gene, the most common of which was the classical enterotoxin genes such as *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, and *sei* with frequencies equal to 59%, 29%, 30%, 3%, 3%, 73%, 13%, and 74% (31). The results of the *sea*, *seg*, *see*, and *sei* genes in this study were similar to ours.

### Conclusion

Tracing of antibiotic resistance, and enterotoxin genes among ACME-*arcA* encoding MRSE strains indicated that clinical samples might represent a potential health hazard. The general objective of controlling hospital infections is to reduce these infections as much as possible. Not only these infections cause secondary complications but they also increase the possibility of food poisoning, which in turn leads to high mortality rates, prolonged hospitalization, and high-cost treatment. Therefore, studies about tracing of such isolates in the nosocomial infections are very recommended.

### Acknowledgements

We thanksgiving Dr. Manouchehr Momeni Shahraki, for his continual kindness and mental contributions during this study.

**Conflict of Interests:** No conflict of interest was announced by the authors.

### Ethical considerations

Ethical issues (Including plagiarism, informed consent, misconduct, data fabrication and/or falsification, double publication and/or submission, redundancy, etc.) have been completely observed by the authors.

#### **Financial Disclosure**

The authors announce that they had no financial interests related to the material in the manuscript.

#### **Funding/Support**

Self-funding.

## References

1. Gordon RJ, Miragaia M, Weinberg AD, Lee CJ, Rolo J, Giacalone JC, et al. *Staphylococcus epidermidis* colonization is highly clonal across US cardiac centers. *Int J Infect Dis*. 2012;205(9):1391-8. doi: 10.1093/infdis/jis218.
2. Aghazadeh M, Ghotaslou R, Rezaee MA, Moshafi MH, Hojabri Z, Saffari F. Determination of antimicrobial resistance profile and inducible clindamycin resistance of coagulase negative staphylococci in pediatric patients: the first report from Iran. *World J Pediatr*. 2015;11(3):250-4. doi: 10.1007/s12519-014-0524-7.
3. Halaji M, Karimi A, Shoaie P, Nahaei M, Khorvash F, Ataei B, et al. Distribution of SCCmec elements and presence of Pantone-Valentine Leukocidin in Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in a University Hospital of Isfahan City, Iran. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(7):DC27. doi: 10.7860/JCDR/2017/25518.10258.
4. Lindgren J, Thomas VC, Olson M, Chaudhari S, Nuxoll AS, Schaeffer C, et al. Arginine deiminase in *Staphylococcus epidermidis* functions to augment biofilm maturation through pH homeostasis. *J Bacteriol*. 2014;196(12):2277-89. doi: 10.1128/JB.00051-14.
5. Danesh M, Rahimi F, Arabestani MR. Antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a referral hospital in Isfahan. *J Clin Infect Dis Trop Med*. 2016; 20(71): 25-31.
6. Wang PJ, Xie CB, Sun FH, Guo LJ, Dai M, Cheng X, Ma YX. Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* on the abdominal skin of females before laparotomy. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):992. doi: [10.3390/ijms17060992](https://doi.org/10.3390/ijms17060992).
7. Shamansouri S, Zadeh V, Khazaei M. Study on the percent of frequency of ACME-Arca in clinical isolates resistant to methicillin-*Staphylococcus epidermidis* in Isfahan, Iran. *J Fundam Appl Sci*. 2016;8(2):1046-57. [http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v8i2S.119](https://doi.org/10.4314/jfas.v8i2S.119)
8. Deplano A, Vandendriessche S, Nonhoff C, Dodémont M, Roisin S, Denis O. National surveillance of *Staphylococcus epidermidis* recovered from bloodstream infections in Belgian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother*. 2016;71(7):1815-9. doi: 10.1093/jac/dkw086.
9. Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Kum E. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *Int J Food Microbiol*. 2010;142(1-2):74-7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.002.
10. Fisher EL, Otto M, Cheung GY. Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Front Microbiol*. 2018; 9: 436. doi: 10.3389/fmicb.2018.00436
11. Karimi M, Esfahani BN, Halaji M, Mobasherizadeh S, Shahin M, Havaei SR, et al. Molecular characteristics and antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in tertiary care hospitals of Isfahan, Iran. *Infez Med*. 2017;25(3):234-40. [PubMed Central:PMID:28956540]
12. Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *TOXINS*. 2018;10(6):252. doi: 10.3390/toxins10060252.
13. Janik E, Ceremuga M, Saluk-Bijak J, Bijak M. Biological toxins as the potential tools for bioterrorism. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(5):1181. doi: 10.3390/ijms20051181.
14. Tuffs S, Haeryfar S, McCormick J. Manipulation of innate and adaptive immunity by staphylococcal superantigens. *Pathogens*. 2018;7(2):53. doi: 10.3390/pathogens7020053
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Twenty-Fourth Edition, M100Ed24E; 2014.

16. Hoveida L, Ataei B, Amirmozafari N, Noormohammadi Z. Species Variety, Antibiotic Susceptibility Patterns and Prevalence of Enterotoxin Genes in Staphylococci Isolated from Foodstuff in Central Iran. *Iranian Journal of Public Health*. 2020 Jan;49(1):96.
17. Adwan G, Adwan K, Jarrar N, Salama Y, Barakat A. Prevalence of *seg*, *seh* and *sei* Genes among Clinical and Nasal *Staphylococcus aureus* Isolates in Palestine. *Br Microbiol Res J*. 2013;3(2):139-49. doi: [10.9734/BMRJ/2013/2913](https://doi.org/10.9734/BMRJ/2013/2913)
18. Du X, Zhu Y, Song Y, Li T, Luo T, Sun G, et al. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. *PLoS One*. 2013;8(5):e62742. doi: 10.1371/journal.pone.0062742.
19. Razavi S, Dadashi M, Pormohammad A, Khoramrooz S S, Mirzaii M, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Arch Clin Infect Dis*. 2018 ; 13(4):e58410. doi: [10.5812/archcid.58410](https://doi.org/10.5812/archcid.58410).
20. Ramazanzadeh R, Salimizand H, Shahbazi B, Narenji H. Prevalence of *mecA* Gene of Methicillin Resistant *Staphylococcus* spp. Isolated from Nosocomial Infections and Environmental Specimens in Sanandaj Hospitals, Kurdistan, Iran. *Res Mol Med*. 2015;3(3):38-42. doi: [10.7508/rmm.2015.03.008](https://doi.org/10.7508/rmm.2015.03.008).
21. Xu Z, Shah HN, Misra R, Chen J, Zhang W, Liu Y, et al. The prevalence, antibiotic resistance and *mecA* characterization of coagulase negative staphylococci recovered from non-healthcare settings in London, UK. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7(1):73. doi: 10.1186/s13756-018-0367-4.
22. Rahimi F, Bouzari M, Katouli M, Pourshafie M R. Antibiotic Resistance Pattern of Methicillin Resistant and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* Isolates in Tehran, Iran, *Jundishapur J Microbiol*. 2013 ; 6(2):144-149. doi: [10.5812/jjm.4896](https://doi.org/10.5812/jjm.4896).
23. Shoja S, Nahaei MR, Nahaei M, Farajnia S, AHANGARZADEH RM, Nikvash S. Study of methicillin-resistance by oxacillin disc diffusion and pcr methods in *Staphylococcus epidermidis* isolates collected from blood cultures and their antibiotic susceptibility. *Med J Tabriz Univ Med Sci*. 2009; 31(1):39-44.
24. Nourbakhsh, F. H. Momtaz. An investigation of antibiotic resistance pattern in the strains of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Isfahan province, Iran. *Qom Univ Med Sci J*. 2016;10(6):68-74.
25. Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA, et al. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette *mec* linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2008;197(11):1523-30. doi: 10.1086/587907.
26. Granslo HN, Klingenberg C, Fredheim EG, Rønnestad A, Mollnes TE, Flægstad T. Arginine catabolic mobile element is associated with low antibiotic resistance and low pathogenicity in *Staphylococcus epidermidis* from neonates. *Pediatr Res*. 2010;68(3):237. doi: 10.1203/00006450-201011001-00463.
27. Miragaia M, de Lencastre H, Perdreau-Remington F, Chambers HF, Higashi J, Sullam PM, et al. Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One*. 2009;4(11):e7722. doi: 10.1371/journal.pone.0007722
28. Pereira VC, Pinheiro L, Oliveira A, Martins KB, Riboli DFM, de Souza MdLR. Expression of superantigens and the *agr* system in *Staphylococcus epidermidis*. *Microb Pathog*. 2018;115:19-24. doi: 10.1016/j.micpath.2017.11.008.
29. Rosenthal ME, Dever LL, Moucha CS, Chavda KD, Otto M, Kreiswirth BN. Molecular

characterization of an early invasive *Staphylococcus epidermidis* prosthetic joint infection. *MICROB DRUG RESIST.* 2011;17(3):345-50. doi: 10.1089/mdr.2010.0157.

30. Vasconcelos N, Pereira V, Júnior JA, da Cunha MdL. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *J APPL MICROBIOL.* 2011;111(3):749-62. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05076.x

31. Pinheiro L, Brito C, de Oliveira A, Martins P, Pereira V, da Cunha M. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: molecular detection of cytotoxin and enterotoxin

genes. *TOXINS.* 2015;7(9):3688-99. doi: 10.3390/toxins7093688

32. Alfatemi SM, Motamedifar M, Hadi N, Saraie HS. Analysis of virulence genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Jundishapur journal of microbiology.* 2014;7(6).

33. Mehrabi F, Asgari A. Resistant Strains of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*; Unknown Risk for Multiple Sclerosis Exacerbation. *Iranian Red Crescent Medical Journal.* 2015;17(9).



## Isolation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strains Containing the *arcA* Gene Producing Enterotoxins A, B, C, D, E, G, and I from Hospital Infections in Isfahan, Iran

Parisa Behshood

Department of Biology, ShK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Corresponding Author: [parisa\\_behshood@yahoo.com](mailto:parisa_behshood@yahoo.com)

### ABSTRACT

*Staphylococcus epidermidis* produces various types of extracellular protein toxins including staphylococcal enterotoxins that act as superantigens, and can provide conditions to attack host cells. The goal of the current study was to determine antibiotic resistance patterns, and detection of prevalent enterotoxin genes in MRSE strains containing the ACME-*arcA* gene in Isfahan.

This survey was done, on a total of 150 staphylococcal isolates acquired from different nosocomial infections. MRSE strains isolated by the PCR procedure. The antimicrobial patterns of MRSE isolates were determined by the disk diffusion procedure. Finally, enterotoxin genes in MRSE strains containing the ACME-*arcA* gene were detected by using the PCR system.

Out of 150 clinical infections, 100 *Staphylococcus epidermidis* strains were isolated. Among 100 *Staphylococcus epidermidis* strains, 65 (65%) isolates were MRSE. Of these, 33 isolates (50.7%) had both *mecA*, and ACME-*arcA* genes. The antimicrobial patterns of MRSE isolates in this study showed that the MRSE isolates exhibited the highest rates of resistance to erythromycin (81.5%), and clindamycin (64.6%), while they showed the lowest resistance to rifampicin (7.6%), and linezolid (1.5%). Moreover, the frequency of enterotoxin genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, and *sei* was reported 60.6%, 63.6%, 66.6%, 15.1%, 6%, 72.7%, 0%, and 75.7% respectively, in the isolates containing the *mecA*, and ACME-*arcA* genes.

The variety of enterotoxin genes types, and resistance index among ACME-*arcA* encoding MRSE are causes for a public health concern; so rapid and accurate reporting of the presence of enterotoxin genes from hospital infections is essential.

**Keywords:** *mecA* gene, Enterotoxins, Antimicrobial susceptibility patterns



# رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۳ شماره ۱ بهار ۱۴۰۴

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



## lncRNAها در بیماری مولتیپل اسکلروزیس

نسرین نصیری<sup>۱\*</sup>، زهرا زمانزاده<sup>۲</sup>، آیدا مهدی پور<sup>۳</sup>، آرین مهدی پور<sup>۴</sup>

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

۲. گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران

۳. گروه علوم تجربی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۴. گروه دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه پدیا تریچیسکی، سنت پترزبورگ، روسیه

اطلاعات مقاله	چکیده
<p><b>تاریخچه مقاله:</b> دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۱۷ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۶ چاپ: بهار ۱۴۰۴</p> <p>DOI: <a href="https://doi.org/10.82415/NACMS.2025.1211343">doi.org/10.82415/NACMS.2025.1211343</a></p> <p><b>کلمات کلیدی:</b> lncRNA، بیماری خود ایمن، مولتیپل اسکلروزیس، بیومارکر</p>	<p>بیماری مولتیپل اسکلروزیس یا ام اس، یک بیماری التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی (CNS) از نوع خود ایمن می باشد که با دمیلیناسیون اکسون و اختلال در پیام رسانی عصب همراه می باشد. ام اس یک بیماری چند عاملی است که ناشی از تعامل محیط، ژنتیک و عوامل اپی ژنتیکی می باشد. از جمله عوامل اپی ژنتیکی موثر در این زمینه انواع RNAهای غیر کد کننده می باشند که در تنظیم بیان ژن ها موثرند. lncRNAها، RNAهای غیر کد کننده ی بلندی هستند که بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید طول دارند و نقش مهمی در تنظیم بیان ژن دارند. بیش از نیمی از lncRNAها در سلول های سیستم عصبی مرکزی بیان می شوند و بیان آنها در تکامل و عملکرد سیستم عصبی حائز اهمیت می باشد. آنها در تکامل قسمت های مختلف مغز و تمایز الیگودندروسیت ها و میلیناسیون دخالت دارند. همچنین مشخص شده است که بیان غیر عادی lncRNAها با تنظیم بیان ژن ها و نیز همکاری در فرایندهای بیولوژیکی، تاثیر بسزایی در پاتوژنز و پیشرفت بیماری های سیستم ایمنی همچون ام اس داشته و نقش مهمی را در تنظیم عملکرد ایمونولوژی ایفاء می کنند.</p> <p>طی مطالعه ی مروری حاضر بررسی مقاله های متعدد در زمینه ی تاثیر lncRNAها بر بیماری ام اس نشان می دهد که lncRNA های HOTAIR، NEAT1، TUG6، ENST00000491934.2، HSP90AA4P، XR-132575.3، lnc DC در بیماری ام اس موثر بوده و lncRNA های GAS5، UC.341، RN7SK، PANDA، THRIL، ENSG00000231898.3، XLOC-010881، TOB1-AS1، linc_MAF- و ENSG00000233392.1 و FAS-AS1، PVT1، lncRNAهای 4 با افزایش بیان و ENSG00000259906.1 و XLOC-010931 با کاهش بیان در افراد بیمار نسبت به افراد سالم و UCA1 و CCAT2 با تفاوت بیان میان زنان بیمار و سالم بالای ۴۰ سال همراه است. بیان غیر عادی lncRNAها در پاتوژنز و پیشرفت بیماری ام اس موثر بوده و امید است با مطالعه بر روی آنها راه درمانی جدید و نیز بیومارکری جهت تشخیص زود هنگام و ارزیابی درمان ها و سیر بیماری ارائه شود.</p>

\* نویسنده مسئول: Email

[nasrinnasiri128@yahoo.com](mailto:nasrinnasiri128@yahoo.com)

## مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس<sup>۱</sup> یک بیماری التهابی خودایمن<sup>۲</sup> مزمن سیستم عصبی مرکزی<sup>۳</sup> (CNS) می باشد که توسط Tcell های CD4+ واسطه گری می شود. این بیماری با دمیالینه شدن اکسون<sup>۴</sup> و آسیب عصبی شناسایی می شود (۱). (۲). بررسی های اپیدمیولوژیک نشان می دهد که بیشترین میزان شیوع ام اس در اروپای شمالی دیده می شود و به گزاری از مرکز ام اس ایران، کشور ایران در ابتدا به بیماری ام اس جزء ده کشور اول دنیا است. پاتوژن این بیماری پیچیده بنظر می رسد و عوامل محیطی، ژنتیکی و اپی ژنتیکی به عنوان فاکتورهای خطر در این بیماری موثر می باشند. تغییرات اپی-ژنتیک مانند متیلاسیون DNA و تغییرات هیستون و RNA- های غیر کد کننده ی پس از نسخه برداری ممکن است بر شروع و پیشرفت بیماری ام اس تاثیر داشته باشد (۳).

<sup>۵</sup>lncRNA ها، RNA های غیر کد کننده ی بلند تنظیمی می باشند که ترجمه نشده و پروتئین رمز نمی کنند و تنها تعداد بسیار اندکی از آنها پپتیدهای کوچکی تولید می کنند. آن ها طولی بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید داشته و در ژنوم یوکاریوت ها وجود دارند (۴، ۵). lncRNA ها در انواع فرایند- های بیولوژیکی دخالت می کنند و گزارش شده است که در بیماری های از بین برنده ی عصب، دیابت، سرطان و بیماری های قلبی- عروقی نقش دارند (۶، ۷). بعلاوه آن ها در تنظیم عملکردهای حیاتی مانند حفظ سلول های بنیادی عصبی، نورون زایی، گلیوژن، هموستاز و اتصالات سیناپتیک دخالت دارند. شواهد نشان می دهد که lncRNA ها نقش کلیدی در تنظیم عملکردهای سیستم ایمنی دارند. بنابراین lncRNA ها ممکن است در بیماری ام اس نیز که یک بیماری خود ایمن است، موثر باشند ولی نقش دقیق آن ها در پاتوژن بیماری ام

اس هنوز بطور کامل مشخص نیست (۵، ۸). شناسایی نحوه ساخت و عملکرد lncRNA ها در بیماری های خود ایمن هنوز نیاز به مطالعات بیشتری دارد. در مجموع مطالعات کاربردی عملکرد بیولوژی lncRNA ها و بیماری های خود ایمن مانند ام اس می تواند در آینده باعث افزایش درک بیماری ها و پاتوژن آنها شود و همچنین تشخیص کلینیکال و مهار بیماری های خود ایمن مبهمی چون ام اس بواسطه ی lncRNA ها عملی گردد.

## مواد و روش کار

در مطالعه ی مروری حاضر با بررسی در پایگاه NCBI و مقاله های متعدد در زمینه ی تاثیر lncRNA ها بر بیماری ام اس، کلید واژه ها مشخص شده و در این زمینه اطلاعات جمع آوری و مورد استفاده قرار گرفت.

## نتایج

lncRNA ها نقش کلیدی را در تنظیم عملکرد سیستم ایمنی ایفا می کنند که در ابتدا به بیماری ام اس موثر می باشند (۹). lncRNA ی GAS5<sup>۶</sup> با نقش تله مانند خود گیرنده ی گلوکوکورتیکوئید (GR) را به دام انداخته و از نسخه برداری ژن های هدف ممانعت بعمل می آورد در نتیجه از رشد سلول جلوگیری کرده و موجب مرگ سلولی می گردد (۱۰). این lncRNA بدلیل ممانعت از تقسیم سلولی می تواند در پاتوژن ام اس و در تنظیم بیان ژن NR3C1<sup>۸</sup> نقش داشته باشد. بیان GAS5 و ژن NR3C1 در بیماران مبتلا به ام اس بررسی گردیده است و نتایج حاکی از افزایش بیان GAS5 در خون بیماران مبتلا به ام اس در مقایسه با افراد سالم می باشد. این یافته ها بر اینکه GAS5 ممکن است نقش مهمی را در اتیولوژی مولکولی و درمانی ام اس ایفا کند، اشاره دارد (۱۱).

<sup>۵</sup> Long non coding RNA

<sup>۶</sup> Growth Arrest Specifiacs

<sup>۷</sup> Glucocorticoid Reseptor

<sup>۸</sup> Nuclear Receptor subfamily 3 group C member 1

<sup>۱</sup> Multiple sclerosis (MS)

<sup>۲</sup> Auto immune

<sup>۳</sup> Central Nervous System

<sup>۴</sup> Demyelination of axon

در مطالعه‌ای که توسط فانگ ژانگ<sup>۹</sup> و همکارانش در سال ۲۰۱۶ انجام شد، عملکردهای lncRNAها بر مبنای هم بیانی ژن‌ها و فرایندهای آنالیز بیولوژیکی تحت مطالعه قرار گرفت و مقدار lncRNAها مانند mRNAها در خون محیطی بیماران ام اس و افراد سالم بعنوان گروه کنترل بررسی شدند و رابطه‌ای میان lncRNA و mRNA مشخص گردید. در نتایج این مطالعه آمده است که در بیماران مبتلا به ام اس نسبت به گروه کنترل سالم بیان ۲۳۵۳ عدد lncRNA و ۱۰۳۷ عدد mRNA افزایش و ۳۸۹ عدد lncRNA و ۲۷۹ mRNA کاهش می‌یابد. در مقایسه‌ای که ما بین افراد مبتلا به ام اس و افراد سالم کنترل انجام گرفت، lncRNAها با اتصال به ژن‌های هدف در تنظیم هدایت اکسون، فعالیت گیرنده‌های هدایت اکسون و تنظیم کموتاکسی سلول‌های اندوتلیال<sup>۱۰</sup> ارتباط داشتند. بسیاری از آن‌ها در پاتوژنز ایمنی بیماری ام اس نقش داشتند، بنابراین این نتایج اطلاعات جدیدی را برای مطالعات بیشتر بر روی ام اس فراهم می‌کند. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که lncRNAی بیان شده‌ی متفاوت ممکن است در فرایند ام اس مهم باشد. با این حال مکانیسم‌های مولکولی خاص و عملکردهای بیولوژی این lncRNAها در پاتوژنز ام اس نیازمند مطالعه بیشتر است (۹). با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیک می‌توان پیش بینی کرد که lncRNAهای متمایز بیان شده احتمالاً قادر به تنظیم بیان ژن بصورت سیس و ترانس می‌باشند (۱۲). در تنظیمات سیس زمانی که یک lncRNA رونویسی می‌شود، بر بیان ژن‌های مجاور تاثیر می‌گذارد. با غربالگری ژن‌های هم بیان در نزدیکی lncRNAهای بیان شده‌ی مختلف، بسیاری از ژن‌های هدف تنظیم کننده سیس کشف شدند. بعنوان مثال ژن HOXC9 ممکن است هدف lncRNA UC.341 باشد که در خون محیطی بیماران مبتلا به ام اس ۲,۹ برابر افزایش بیان نشان

داده است. گزارش شده که HOXC9 موجب تنظیمات مجموعه‌ای از ژن‌ها برای هماهنگی فرایندهای سلول‌های مختلف در تمایز عصب می‌شود (۹).

مثال دیگر از تنظیم سیس ژن DDIT4 است که بالا دست ENS00000491934.2 می‌باشد و ۲/۸۷ برابر افزایش بیان را در بیماران ام اس نسبت به افراد سالم نشان می‌دهد. پروتئین DDIT به میتوکندری متصل شده و نقش مهمی را در کاهش تولید و انتشار<sup>۱۱</sup> ROS ایفا می‌کند که یکی از عوامل مهم پاتوژنز در ام اس می‌باشد (۱۳, ۱۴). داده‌ها نشان می‌دهد که بیان DDIT4 برای بقاء سلول‌های بنیادی ضروری می‌باشد زیرا تنها سلول‌هایی که بیان بالایی از این ژن دارند قادر به مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو (ROS) هستند. سلول‌هایی که این ژن‌ها را به اندازه‌ی کافی بیان نمی‌کنند احتمالاً قبل از رسیدن به حالت بالغ می‌میرند، بنابراین تصور می‌شود که lncRNAهای ENS00000491934.2 و HSP90AA4P ممکن است در پاتوفیزیولوژی ام اس با تنظیم بیان ژن‌های HOXC9 و DDIT4 دخیل باشند. در مدل ترانس lncRNA می‌تواند بر روی ژن‌های هدف خود از طریق اتصال به فاکتورهای رونویسی عمل کند. برای مثال lncRNA XR-132575.3 می‌تواند نسخه برداری NKX2-5 را تحت تاثیر قرار دهد (۹). اولین گزارش در مورد بیان lncRNAهای HOTAIR<sup>۱۲</sup> و ANRIL<sup>۱۳</sup> در بیماران مبتلا به ام اس در زمینه‌ی عملکرد ویتامین D توسط پهلوان و همکارانش در سال ۲۰۱۷ انجام گرفت. در این مطالعه نشان داده شد که lncRNA HOTAIR با پاتوژنز بیماری ام اس در ارتباط می‌باشد ولی در مورد lncRNA ANRIL این ارتباط دیده نشد (۱۵). حساسیت سلول به HOTAIR و مهار فاکتور نکروز تومور α (TNFα)، آپوپتوز را القاء می‌کند و بطور خاص در پاتوژنز سرطان دخیل می‌باشد. اطلاعات کمی

<sup>۱</sup> HOX transcript antisense intergenic RNA

<sup>۱</sup> Antisense lncRNA of the NK4 locus

<sup>۹</sup>Fang Zhang

<sup>۱</sup> Regulation of endothelial cell chemotaxis

<sup>۱</sup> Reactive Oxygen Sensitive <sup>۱</sup>

در مورد بیان HOTAIR و اثرات آن در بیماری‌های وابسته به سیستم ایمنی مانند ام اس وجود دارد. عملکرد ویتامین D بعنوان یک عامل اپیژنتیک بواسطه‌ی lncRNAها تنظیم می‌گردد (۴). بنظر می‌رسد که ویتامین D تاثیر بسزایی در بیان HOTAIR و مکانیسم‌های مربوط به التهاب دارد که در پاتوژنز بیماری ام اس و انسفالومیلیت<sup>۱</sup> ادخیل می‌باشد (۱۵). جایگاه این lncRNA داخل خوشه ژنی HOX C بر روی کروموزوم ۱۲ می‌باشد. رین و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان داده‌اند که HOTAIR بر کروماتین خاموش کننده HOX D بر روی کروموزوم ۲ می‌باشد. HOTAIR عملکرد زیستی خود را با فراخواندن و اتصال مجموعه‌های بازآرایی کروماتین به HOX D اعمال می‌کند. در واقع این lncRNA موجب تنظیم بیان ژنهای HOX انسانی می‌شود و نقش مهمی در تنظیم اپیژنتیک دارد (۱۴، ۱۶). lncRNAی ANRIL در بیماری‌های چند شکلی بعنوان یک نقطه‌ی داغ بشمار می‌رود. این lncRNA باعث کنترل تقسیم سلولی شده و نسبت به پاسخ‌های التهابی نقش تنظیمی دارد. این lncRNA از طریق عملکرد اپیژنتیکی بر بیان ژن مجاور خود که CDKN2 A/B است تاثیر می‌گذارد (۱۷). سانتورو و همکارانش طی تحقیقاتی نشان دادند که سه lncRNAی<sup>۱۵</sup> NEAT1 و<sup>۱۶</sup> TUG1<sup>۱۷</sup> RN7SK نقش مهمی را در فرایندهای از بین برنده‌ی عصب بازی می‌کنند که این نتایج حاکی از آن است که این lncRNAها ممکن است در پاتوژنز بیماری ام اس ادخیل باشند (۱۸). به نظر می‌رسد مشارکت NEAT1 در ساخت Para speckle در سیگنالینگ TLR<sup>۳</sup> اهمیت داشته باشد (۱۸). Para speckleها برای رونوشت برداری توسط RNA pol II در هسته لازم بوده و در باز کردن

DNA و فرایندهای رونویسی و نیز پردازش نقش ایفا می‌کنند (۱۹). آن‌ها پس از رونویسی با نگهداری از mRNA می‌پردازش شده می‌توانند بیان ژن را تنظیم کنند (۲۰). NEAT1 بیان IL8 را با دور نگه داشتن یک پروتئین Para speckle سرکوب کننده از پروموتور، افزایش می‌دهد بنابراین IL-8 در سرم افراد مبتلا به RRMS<sup>۳</sup> و همچنین در مغز افراد بیمار افزایش می‌یابد (۱۸).

lncRNAی دیگر TUG1 می‌باشد که هدف پائین دست ژن P53 است، که در فرایند آپوپتوز و از بین رفتن عصب دخیل می‌باشد. lncRNA RN7SK قسمتی از کمپلکس کیناز سلولی PTEFb را سرکوب می‌کند که در تمایز سلولهای T CD4<sup>+</sup> دخیل می‌باشد. این lncRNA می‌تواند بعنوان یک عنصر التهاب در بیماری ام اس و بیماری IIM<sup>۲۰</sup> موثر باشد. مشخص شده است که lncRNA RN7SK در هر دو این بیماری‌ها افزایش بیان نشان می‌دهد (۱۸). lncRNAی<sup>۲۱</sup> PANDA بطور معناداری در خون محیطی افراد بیمار نسبت به افراد سالم افزایش بیان دارد. این lncRNA با اتصال به فاکتور رونویسی NF-YA در مهار آپوپتوز نقش دارد (۲۱). همچنین سه lncRNAی ENSG00000231898.3 و XLOC-009626 و نیز XLOC-010881 در بیماران مبتلا به ام اس نسبت به افراد سالم افزایش و سه lncRNAی ENSG00000233392.1 و XLOC-010931 در افراد بیمار کاهش بیان نشان می‌دهند (۹). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که lncRNAی<sup>۲۲</sup> THRIL در افراد بیمار نسبت به افراد سالم افزایش بیان داشت و lncRNAهای<sup>۲۳</sup> PVT-1 و FAS-AS1<sup>۲۴</sup> دارای کاهش بیان بود که عملکرد آنها در

<sup>2</sup> Idiopathic Inflammatory Myopathy

<sup>2</sup> P21 associated ncRNA DNA damage activated

<sup>2</sup> TNF- $\alpha$  and heterogenous nuclear ribonucleoprotein L

<sup>2</sup> Plasmacytoma variant translocation 1

<sup>2</sup> Fas cell surface deat receptor antisense 1

<sup>1</sup> Encephalomyelitis

<sup>1</sup> Nuclear Enriched Abundant transcript 1

<sup>1</sup> Taurin up-regulated 1

<sup>1</sup> 7SK small nuclear RNA

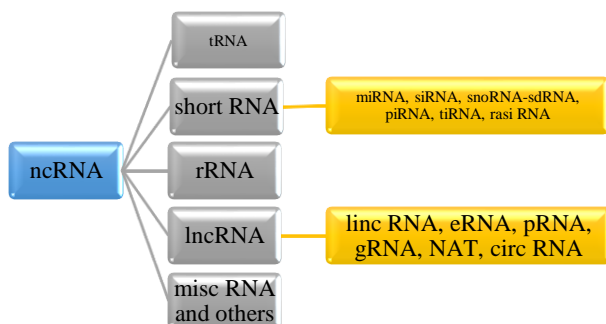
<sup>1</sup> Tool like reseptor 3

<sup>1</sup> Relapsing Remitting Multiple Sclerosis

ام اس هنوز در ابتدای مسیر بوده و مستلزم تحقیقات بیشتری می باشد.

### بحث

بیماری ام اس یک بیماری التهابی با منشا خود ایمنی است که سیستم اعصاب مرکزی را درگیر می کند (۲۷). نتایج تحقیقات اخیر نشان می دهد که بیان غیر عادی lncRNAها و تنظیمات آنها بر روی بیان ژن ها می تواند بر ایجاد و سیر پیشرفت بیماری موثر باشد و تفاوت های معنی داری در سطح بیان lncRNAها در افراد بیمار مبتلا به ام اس نسبت به افراد سالم وجود دارد. همچنین RNAهای غیر کد کننده در حفظ و نگهداری هموستاز بافت و سایر فرایندهای فیزیولوژیک هسته می توانند موثر باشند (۲۵، ۲۶). آنها محافظت شدگی کمتری در یک گونه دارند و بیان آنها در بافت و سلول دارای الگوی ویژه ای بوده و در سطح پائین و بیشتر در مغز و بیضه بیان می شوند (۲۸).



شکل ۱- تقسیم بندی RNAهای غیر کد کننده: lncRNAها را بر اساس مشخصاتشان به گروه های (۱) enhancer lncRNA (eRNAs) که از تقویت کننده های ژنی رونوشت برداری می شود. (۲) CircRNA که رده ی

پاتوژن بیماری ام اس هنوز بخوبی شناخته نشده است (۲۲). در سال های اخیر ژانگ و همکارانش نشان دادند که linc-MAF-4 افزایش بیان معناداری در PBMCS افراد مبتلا به ام اس نسبت به افراد سالم دارد. خاصیت بازدارندگی MAF که یک فاکتور رونویسی سلول Th2 است، باعث تسهیل در تمایز Th1 و محدودیت در تمایز Th2 می گردد. بنابراین linc-MAF-4 با هدف قرار دادن MAF در تنظیم تمایز Th1 و Th2 نسبت Th1 را بر Th2 افزایش داده و باعث ایجاد بیماری می گردد (۲۳). در مطالعه ای میزان بیان ژن lncRNA TOB1-AS1 در سلول های سفید خون محیطی بیماران ام اس از نوع عود کننده- بهبود یابنده در مقایسه با افراد سالم بررسی شد. نتایج افزایش معنی دار بیان TOB1 را در بیماران نسبت به افراد کنترل نشان داد که در مردان و زنان این بیان متفاوت بود که نشان دهنده ی تاثیر احتمالی هورمون های جنسی بر روی این ژن است. نتایج این مطالعه نقش احتمالی ژن TOB1-AS1 را در پاتوژن بیماری مولتیپل اسکلروزیس نشان می دهد (۲۴). در رابطه با بیان دو lncRNA UCA1<sup>۲۶</sup> و CCAT2<sup>۲۷</sup> میان افراد بیمار و سالم تفاوتی دیده نشده است ولی تفاوت معناداری در بیان این دو lncRNA میان زنان بیمار و سالم بالای ۴۰ سال مشاهده شده است. نتایج نشان می دهد که اثرات این دو lncRNA با هم بر روی پاتوژن بیماری ام اس موثر بوده که بر مسیر سیگنالینگ سلولی چون WNT و NF-Kb تاثیر می گذارند (۲۱). بطور کلی مطالعات اخیر نشان می دهد که lncRNAها نقش مهمی در تنظیم بیان ژن دارند و بیان غیر عادی آنها اغلب در پاتوژن و پیشرفت بسیاری از بیماری ها دخیل می باشند و بطور نزدیک با سیستم ایمنی در ارتباط هستند (۲۵، ۲۶). به هر جهت تشخیص تغییرات lncRNAها در بیماری

<sup>2</sup> Cancer Associated Transcript 2

<sup>2</sup> Long intervening non coding RNA

<sup>2</sup> Urothelial Carcinoma Associated 1

جدیدی از lncRNA ها هستند که بصورت حلقوی می باشند.  
۳) ultra lncRNA-a (activated lncRNA gene)  
۴) conserved elements gene (pseudogene)  
۵) telomere associated noncoding RNA (TERRAs)  
۶) transcribed Ultra Conserved Regions (TUCRs)  
طبقه بندی می کنند.

همانگونه که قبلا اشاره شد lncRNA ها نقش مهمی در بیماری های خودایمن مانند ام اس بازی می کنند (۲۹). در بیماری ام اس سلول های ایمنی موجود در خون محیطی در پاسخ به فرایندهای التهابی ناشی از عوامل پاتوژن، فعال شده، از سد خونی مغزی عبور کرده و می توانند آنتی بادی هایی را آزاد کنند که غلاف میلین و سلول های گلیا<sup>۸</sup> را هدف قرار دهد و منجر به مرگ سلولی الیگودندروسیت ها شده که در نهایت موجب فاگوسیت شدن میلین مرده و تخریب شده، توسط ماکروفاژها می شود. از بین رفتن میلین منجر به کاهش تحریک پذیری و مختل شدن انتقال عصبی می گردد (۳۰).  
۳۱) مشخص شده است که lncRNA ها در پاتوژن بیماری های التهابی خودایمن مانند اریتماتوزیس لوپوس سیستمیک<sup>۲</sup>، آرتریت روماتوئید<sup>۳</sup>، پسوریازیس<sup>۱</sup>، سندروم شوگرن اولیه<sup>۳۲</sup> و مالتیپل اسکلروزیس از طریق تاثیر بر فاکتورهای تنظیمی تعدادی از ژن ها و مسیرهای آنها همچون سیگنالینگ حائز اهمیت می باشند (۴، ۳۲). فعالیت متفاوت سلول های ایمنی و توسعه نامتعادل سلول های B، T و NK در بیماری های خود ایمن می تواند بطور مستقیم با lncRNA ها ارتباط داشته باشند (۲۹). lncRNA با اثر تنظیم کنندگی بر تعامل پروتئین- پروتئین قسمت های مهم فرایندهای ایمنی (واسطه های التهابی، تمایز و مهاجرت سلول) را تحت کنترل قرار می دهد (۳۳). در شرایط مختلف پاتولوژیکی مانند سرطان و بیماری های سیستم عصبی،

خطای رونویسی از lncRNA های متفاوت در پاسخ به فعال سازی سلول های ایمنی دیده می شود (۳۴). در مجموع اگر چه هزاران lncRNA در ژنوم پستانداران توسط آنالیز بیو- انفورماتیک از داده های نسخه برداری شده شناسایی شده اند، ولی دانش ما از خصوصیات کاربردی آنها بعنوان یک سطح نظارتی تاثیرگذار بر سیستم ایمنی و عملکرد آن، تا حد زیادی ناقص است (۳۵).

### نتیجه گیری کلی

با توجه به تحقیقات اخیر که انجام شده است، نتایج نشان دهندهی این است که بیان غیر عادی lncRNA ها و تنظیمات آنها بر روی بیان ژن ها می تواند بر ایجاد و سیر پیشرفت بیماری موثر باشد و تفاوت های معنی داری در سطح بیان lncRNA ها در افراد بیمار مبتلا به ام اس نسبت به افراد سالم وجود دارد. در آینده ای نزدیک با برنامه های کاربردی در شرایط آزمایشگاه و بدن انسان، شاهد پیشرفت تکنیک های بیولوژی مولکولی همانند برش های ژنی و تولید توالی های ژنی خواهیم بود که شاید دستکاری lncRNA ها بتواند در درمان بیماری های خودایمن سودمند باشد. مطالعات گسترده بر روی lncRNA ها و مکانیسم ویژهی آنها می تواند امید زیادی را در محققین حوزه ژنتیک برای درمان بیماری های پیچیده ای مانند سرطان و بیماری های خود ایمن از جمله ام اس ایجاد کند. امید است تحقیقات بر روی lncRNA ها راه درمانی برای بیماران و نیز بیومارکری برای ارزیابی تلاشهای درمانی و سیر پیشرفت بیماری ارائه دهد.

<sup>1</sup> Psoriasis  
<sup>2</sup> Primary Sjogren's Syndrome<sup>3</sup>

<sup>8</sup> gelia cells  
<sup>2</sup> Systemic Lupus Erythematosus  
<sup>3</sup> Rheumatoid Arthritis<sup>0</sup>

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از اساتید گرانقدر حوزه ژنتیک و بیوتکنولوژی  
دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی (ره)، دانشگاه اصفهان و  
دانشگاه آزاد شهرکرد کمال امتنان و سپاس داریم.



## مراجع

1. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature immunology*. 2007;8(9):913.
2. Zamanzadeh Z, Ahangari G, Ataei M, Pouragahi S, Nabavi SM, et al. Association of new putative epitopes of myelin proteolipid protein (58-74) with pathogenesis of multiple sclerosis. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2016;15(5):394-402.
3. Calabrese R, Valentini E, Ciccarone F, Guastafierro T, Bacalini MG, et al. TET2 gene expression and 5-hydroxymethylcytosine level in multiple sclerosis peripheral blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014;1842(7):1130-6.
4. Singh RP, Massachi I, Manickavel S, Singh S, Rao NP, et al. The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2013;12(12):1160-5.
5. Song X, Cao G, Jing L, Lin S, Wang X, et al. Analysing the relationship between lnc RNA and protein-coding gene and the role of lnc RNA as ce RNA in pulmonary fibrosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014;18(6):991-1003.
6. Carrieri C, Forrest AR, Santoro C, Persichetti F, Carninci P, et al. Expression analysis of the long non-coding RNA antisense to Uchl1 (AS Uchl1) during dopaminergic cells' differentiation in vitro and in neurochemical models of Parkinson's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9:114.
7. Chang YN, Zhang K, Hu ZM, Qi HX, Shi ZM, et al. Hypoxia-regulated lncRNAs in cancer. *Gene*. 2016;575(1):1-8.
8. Wan G, Hu X, Liu Y, Han C, Sood AK, et al. A novel non-coding RNA lncRNA-JADE connects DNA damage signalling to histone H4 acetylation. *The EMBO journal*. 2013;32(21):2833-47.
9. Zhang F, Gao C, Ma XF, Peng XL, Zhang RX, et al. Expression Profile of Long Noncoding RNA s in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Multiple Sclerosis Patients. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2016;22(4):298-305.
10. Kugel JF, Goodrich JA. Non-coding RNAs: key regulators of mammalian transcription. *Trends in biochemical sciences*. 2012;37(4):144-51.
11. Gharesouran J, Taheri M, Sayad A, Ghafouri Fard S, Mazdeh M, et al. The growth arrest-specific transcript 5 (GAS5) and nuclear receptor subfamily 3 group C member 1 (NR3C1): novel markers involved in multiple sclerosis. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2018;7(2):102.
12. Bassett AR, Akhtar A, Barlow DP, Bird AP, Brockdorff N, et al. Science forum: considerations when investigating lncRNA function in vivo. *elife*. 2014;3:e03058.
13. Horak P, Crawford AR, Vadysirirack DD, Nash ZM, DeYoung MP, et al. Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(10):4675-80.
14. Mao L, Ding J, Zha Y, Yang L, McCarthy BA, et al. HOXC9 links cell-cycle exit and neuronal differentiation and is a prognostic marker in neuroblastoma. *Cancer research*. 2011;71(12):4314-24.
15. Pahlevan Kakhki M, Nikravesch A, Shirvani Farsani Z, Sahraian MA, Behmanesh M. HOTAIR but not ANRIL long non-coding RNA contributes to the pathogenesis of multiple sclerosis. *Immunology*. 2018;153(4):479-87.
16. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *cell*. 2007;129(7):1311-23.
17. Yap KL, Li S, Muñoz Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Molecular cell*. 2010;38(5):662-74.
18. Santoro M, Nociti V, Lucchini M, De Fino C, Losavio FA, et al. Expression profile of long non-coding RNAs in serum of patients with multiple sclerosis. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2016;59(1):18-23.
19. Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, et al. MEN ε/β nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of

- paraspeckles. Genome research. 2009;1.۵۹-۳۴۷:(۳)۹
20. Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, et al. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. Molecular cell. 2009;33(6):717-26.
21. Dastmalchi R, Omrani MD, Mazdeh M, Arsang-Jang S, Movafagh A, et al. Expression of Long Non-Coding RNAs (UCA1 and CCAT2) in the Blood of Multiple Sclerosis Patients. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2018;20.(۸)
22. Eftekharian MM, Ghafouri Fard S, Soudyab M ,Omrani MD, Rahimi M, et al. Expression analysis of long non-coding RNAs in the blood of multiple sclerosis patients. Journal of Molecular Neuroscience. 2017;63(3-4):333-41.
23. Zhang F, Liu G, Wei C, Gao C, Hao J. Linc-MAF-4 regulates Th1/Th2 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis by targeting MAF. The FASEB Journal. 2016;31(2):519-25.
24. Dehghanzad R, Kakhki MP, Alikhah A, Sahraian MA, Behmanesh M. The Putative Association of TOB1-AS1 Long Non-coding RNA with Immune Tolerance: A Study on Multiple Sclerosis Patients. Neuromolecular medicine. 2019:1-11.
25. Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. Nucleic acids research. 2012;40(14):63.۴۰۰-۹۱
26. Sun L, Goff LA, Trapnell C, Alexander R, Lo KA, et al. Long noncoding RNAs regulate adipogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(9):3387-92.
27. Zamanzadeh Z, Ataei M, Nabavi SM, Ahangari G, Sadeghi M , et al. In Silico Perspectives on the Prediction of the PLP's Epitopes involved in Multiple Sclerosis. Iranian journal of biotechnology. 2017;15(1):10.
28. Pauli A, Valen E, Lin MF, Garber M, Vastenhouw NL, et al. Systematic identification of long noncoding RNAs expressed during zebrafish embryogenesis. Genome research. 2012;22(3):577-91.
29. Sigdel KR, Cheng A, Wang Y, Duan L, Zhang Y. The emerging functions of long noncoding RNA in immune cells: autoimmune diseases. Journal of immunology research. 2015;2015.
30. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. Neuron. 2006;52(1):61-76.
31. Pouragahi S, Nassiri Asl M, Sahraian MA, Sadeghi M, Zamanzadeh Z, et al. Utility of Myelin Basic Protein as an Early Prognostic Biomarker in Multiple Sclerosis. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2017;19.(۳)
32. Jimenez SA, Piera-Velazquez S. Potential role of human-specific genes, human-specific microRNAs and human-specific non-coding regulatory RNAs in the pathogenesis of Systemic Sclerosis and Sjögren's Syndrome. Autoimmunity reviews. 2013;12(11):1046-51.
33. Wang P, Xue Y, Han Y, Lin L, Wu C, et al. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. Science. 2014;344(6181):310-3.
34. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nature reviews genetics. 2011;12(12):861.
35. Spurlock III CF, Tossberg JT, Guo Y, Collier SP, Crooke III PS, et al. Expression and functions of long noncoding RNAs during human T helper cell differentiation. Nature communications. 2015;6:6932.

## lncRNAs in multiple sclerosis

Nasiri N<sup>\*1</sup>, Zamanzadeh Z<sup>2</sup>, Mahdipour A<sup>3</sup>, Mahdipour A<sup>4</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
  2. *Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Ashrafi Isfahani University, Esfahan, Iran*
  3. Department of Experimental Sciences, Isfahan University, Isfahan, Iran
  4. Department of Dentistry, Faculty of Dentistry, Pedia Trichisky University, St. Petersburg, Russia
- \*Corresponding author:** nasrinnasiri128@yahoo.com

### Abstract

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory and Autoimmune disease of the CNS, which is associated with axon demyelination and disruption of nerve signaling. MS is a multifactorial disease caused by the interaction of environment, genetics and epigenetic factors. Among the effective epigenetic factors in this field are types of ncRNAs that are effective in regulating gene expression. lncRNAs are long non-coding RNAs that are more than 200 nucleotides long and play an important role in regulating gene expression. More than half of lncRNAs are expressed in the cells of the central nervous system, their expression is important in the development and function of the nervous system. They are involved in the development of different parts of the brain, the differentiation of oligodendrocytes and myelination. It has also been found, the abnormal expression of lncRNAs by regulating gene expression and cooperation in biological processes has a significant impact on the pathogenesis and progression of immune system diseases like MS and plays an important role in regulating the function of immunology. In the present review study, a review of articles on the effect of lncRNAs on MS shows that lncRNAs like HOTAIR, NEAT1, TUG6, ENST00000491934.2, HSP90AA4P, XR-132575.3, lnc DC are effective in MS, GAS5, UC.341, RN7SK, PANDA, THRIL, ENSG00000231898.3, XLOC-009626, XLOC-010881, TOB1-AS1 and linc\_MAF-4 with increased expression and PVT1, FAS- AS1, ENSG00000233392.1, ENSG00000259906.1 and XLOC-010931 are associated with decreased expression in patients compared to healthy individuals, and UCA1 and CCAT2 are associated with expression differences between diseased and healthy women over 40. Abnormal expression of lncRNAs is effective in the pathogenesis and progression of MS, and it is hoped that by studying them, new therapeutic approaches and biomarkers for early diagnosis and evaluation of treatments and the course of the disease will be provided.

Keywords: lncRNA, autoimmune disease, multiple sclerosis, biomarker



# رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۳ شماره ۱ بهار ۱۴۰۴

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



کلونینگ و آنالیز فیلوژنتیکی ژن gag ویروس نقص ایمنی گاوی در جدایه‌های ایرانی

الهه تاج بخش\*

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

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخچه مقاله:</p> <p>دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۰۳</p> <p>پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۹</p> <p>چاپ: بهار ۱۴۰۴</p> <p>DOI: doi.org/10.82415/NACMS.2025. 1212999</p> <p>کلمات کلیدی:</p> <p>آنالیز فیلوژنتیکی، ویروس نقص ایمنی گاوی، ژن gag، وکتور pTZ57R/T، وکتور pGEX-4T-3</p> <p>* نویسنده مسئول: Email: <a href="mailto:ee_tajbakshh@yahoo.com">ee_tajbakshh@yahoo.com</a></p>	<p>ویروس نقص ایمنی گاوی عضوی از خانواده رتروویریده، جنس لنتی ویروس، دارای سه ژن مهم به نام‌های gag، pol و env است. محصول PCR ژن gag ویروس نقص ایمنی گاوی جدا شده از مناطق مختلف ایران، در ناقل pTZ57R/T کلون شد؛ سپس قطعات الحاقی توسط آنزیم‌های محدودکننده BamHI و XhoI هضم و سپس در ناقل بیانی pGEX-4T-3 کلون شدند. تجزیه و تحلیل توالی‌های ژن gag ویروس نقص ایمنی گاوی به دست آمده از قطعه الحاقی انجام شد. توالی gag ویروس نقص ایمنی گاوی ایرانی با ۵ توالی متناظر دیگر از BIV جدا شده در کشورهای مختلف مقایسه شد. در نهایت، مشخص شد که تجزیه و تحلیل نوکلئوتیدی توالی‌ها، تنوعی بین ۰/۴ تا ۱۰/۶ درصد را نشان می‌دهد و رسم درخت فیلوژنتیکی دو خوشه را در آن آشکار کرد.</p>

## Introduction

Bovine immunodeficiency virus (BIV) is a lentivirus causing lymphadenopathy, lymphocytosis, central nervous system lesions, progressive weakness and emaciation (1-3). Studies have shown that BIV resembles human immunodeficiency virus (HIV) type1 and other lentiviruses, e.g., equine infectious anemia virus and feline immunodeficiency virus, in its structural, genetic, antigenetic and biological properties (4-6).

Basically all lentiviruses infect monocyte/macrophage cells. Moreover, feline immunodeficiency virus (FIV), simian immunodeficiency virus (SIV) and human immunodeficiency virus (HIV) infect T cells and consequently, are mainly associated with clinical signs of immunodeficiency in the infected hosts (7-10).

Bovine immunodeficiency virus (BIV) is an enveloped virus 120–130 nm in diameter. The bilayer viral envelope, which containing the viral surface (SU) gp100 and transmembrane (TM) gp45 proteins, surrounds conical-shaped capsid (CA) and nucleocapsid (NC) structures that

protect the BIV genome. The genome is composed of a capped and polyadenylated diploid RNA 8482 nucleotides in length that is closely associated with viral proteins p7 and p13 (11).

The lentivirus genome offers a complex structure including several regulatory/accessory genes that encode proteins, some of which involved in the regulation of virus gene expression (12).

The BIV proviral DNA is 8960 nucleotides long and resembles other retroviruses with the typical 5'–3' *gag*, *pol* and *env* gene arrangement. Besides, the major structural genes of BIV (*gag*, *pol* and *env*) encode polypeptide precursors to generate structural (Gag and Env) and viral enzyme (reverse transcriptase, integrase and protease) proteins. Furthermore, the *gag* (for group antigen-associated gene) gene, located downstream from the 5' LTR, encodes the Gag (Gag Pr53) precursor protein. It also encodes a portion of the Gag-Pol (Pr170) precursor (13-15). In addition, the BIV genome has been cloned, and the complete nucleotide sequence has been determined (5). Among the structural properties

predicted by the nucleotide and amino acid sequences of BIV is, however, the core protein encoded by the *gag* gene.

The Gag precursor of BIV has been shown to have a molecular mass of 53KDa, and by analogy to HIV cleavage products, p17, p26 and p15, which are the matrix, capsid and nucleocapsid proteins, respectively (16). The *gag* gene product is also an important viral antigen that induces a strong immune response in infected cattle. Recently, a purified recombinant BIV Gag protein was used in an immunoblot assay to detect BIV antibodies in field bovine serum samples.

In this study, the *gag* gene of BIV from Iranian isolated viruses was cloned in *E.coli* and finally phylogenetic analysis of the *gag* gene was determined.

## Material and Methods

### 1- Sample, plasmids and bacterial strains:

The extracted DNA from buffy coat of five BIV infected cows isolated from shahrekord and isfahan, Iran, and showing positive molecular results based on PCR were selected to be cloned. Besides plasmids pTZ57R/T (Ins T/A clone PCR Cloning kit, Fermentas) and pGEX-4T-3

(Pharmacia) and *E.coli* strain JM107 (Fermentas) were used for cloning, sequencing and maintenance of DNA fragment. The required antibiotics were added to LB media according to the reference recommendation (14).

2-Primers design: Primers were designed according to the published sequence for proviral genome of BIV (accession number: M32690.1).

BIV-gag-F: 5'-  
GGATCCGAGGCCAGAGCTGATAAGGAA-  
3'contain *Bam*HI site. Reverse primer, BIV-gag-R: 5'-  
CTCGAGATCCCACTACCCTACATGCT-3'

contain recognition site for *Xho*I. The restriction enzyme sites (underlined) were also added to the primers for subsequent cloning procedure.

3- Gene amplification of *gag* : PCR was performed in a 50μl total volume containing 1μg of template DNA, 1 μM of each primer, 2 mM Mgcl<sub>2</sub>, 200μM dNTP, 1x PCR buffer and 2 unit of Taq DNA polymerase (Roche applied science). In addition, the following conditions were provided for amplification: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 33 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 59°C for 60s and extension at 72°C for 50s. The

program followed by a final extension at 72°C for 10 min. Further, the PCR product was analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel in 1X TBE buffer and visualized by ethidium bromide staining on UV transilluminator. The PCR product was purified by High pure PCR product purification kit (Roche applied science) according to the manufacturer recommendation.

4- Cloning of *gag* gene: The PCR product was digested with *Bam*HI and *Xho*I and ligated to pTZ57R/T and pGEX-4T-3, digested by the same restriction enzymes, using T4 DNA ligase (Invitrogen) at 14°C overnight. *E.coli* JM107 competent cells were also prepared by calcium chloride method and were used for transformation of pTZ57R/T-*gag* and pGEX-4T-3-*gag* vectors, respectively. In addition, the transformed bacteria were selected by screening the colonies on LB media containing antibiotic. The suspected colony was further analyzed by sequencing and PCR (14).

5- Sequence analysis: The nucleotide sequences were edited using Edit View v.1.0.1 (Applied Bioscience, Australia) and the 5 sequences registered in GenBank (accession numbers: NC001413-USA, L64972-USA,

EF661980-IRAN, EF661988-IRAN, AY426724-India) were aligned separately using the Clustal W v1.81 in order to obtain a consensus sequence. Subsequently, the sequences were analyzed using the BioEdit package v.7.0.4.1 to compare the nucleotide sequences.

The nucleotide sequence of the Iranian BIV *gag* gene was then compared with the corresponding sequences from other regions of the world. An unrooted dendrogramme was constructed using the Njplot software. Finally, statistical support for the dendrogramme was obtained by bootstrapping using 1000 replicates.

## Results

DNA amplification: The proviral DNA of BIV virus from buffy coat of 5 BIV infected cows in Iran was prepared and used as template for amplification and cloning of the *gag* gene. The amplified fragment had the expected size of 754bp comparing to 1kb DNA ladder (Fermentas) (Figure1)

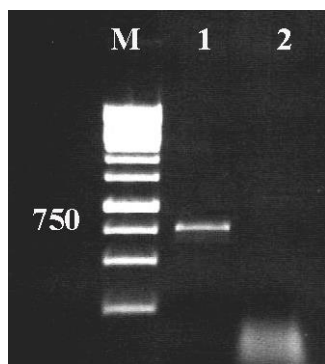


Figure 1- *gag* gene amplification by PCR (Lane M, Molecular weight marker 1 kb DNA ladder; Lane 1: amplified *gag* gene in sample; Lane 2, Negative control)

**PCR product cloning:** The purified PCR products were cloned in pTZ57R/T and pGEX-4T-3 vectors and digestion with *Bam*HI and *Xho*I enzymes. Figure 2 shows recombinant plasmids after digestion.

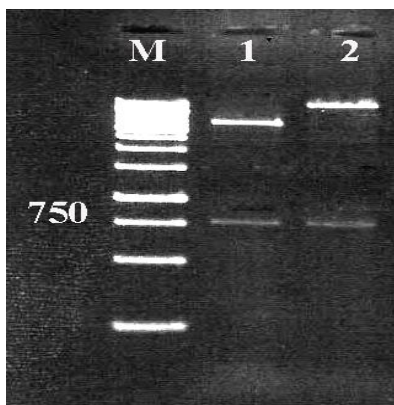


Figure 2- Restriction enzyme analysis of recombinant pTZ57R/T and pGEX-4T-3 plasmids (Lane M, Molecular weight marker 1kb DNA ladder; Lane 1, digestion of recombinant pTZ57-R/T plasmid; Lane 2, digestion of recombinant pGEX-4T-3 plasmid)

The recombinant plasmids (pTZ57R/T-*gag* and pGEX-4T-3-*gag*) were sequenced by specific primers and Sanger sequencing method (Macrogen, Korea). The sequencing result was confirmed through being compared with databases and also using basic local alignment search tool (BLAST) software. The result of sequencing of the *gag* fragment using ClustalX (1.81) software was aligned with some of the registered sequences in Genebank such as the sequences of this gene in India and USA. After comparing differences and similarities by using Njplot software, the phylogenetic tree was drawn which is shown in figure 3.



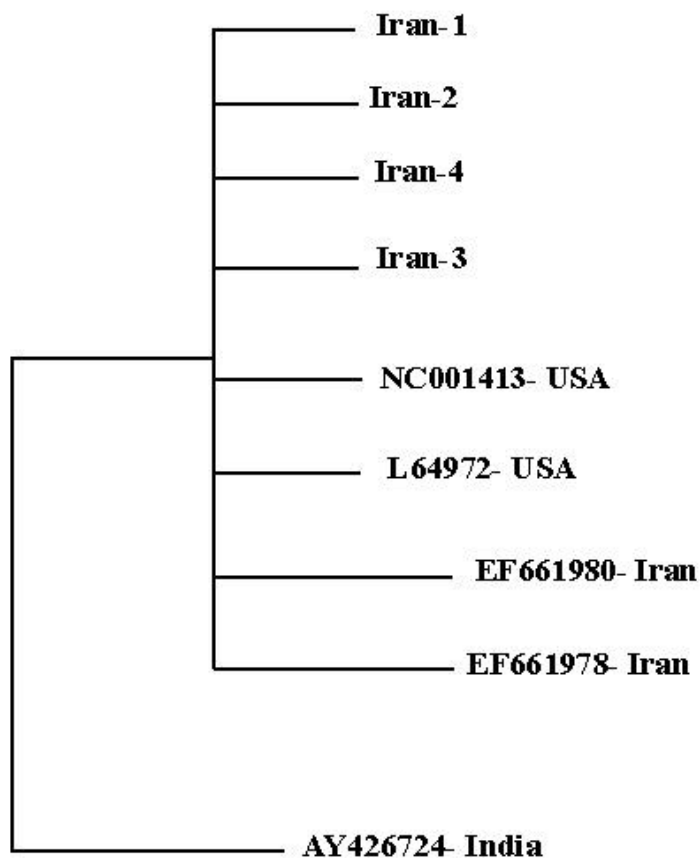


Figure 3- Phylogenetic tree of the sequence of the BIV virus *gag* gene in Iranian isolates and in other countries

## Discussion

One of the main goals of this research, achieved for the first time in Iran, was trace the *gag* gene of BIV in the infected samples of this virus, presence of the corresponded gene was also confirmed with the help of sequencing of the fragment.

Given that primers applied for identification of the *gag* gene in this study involved the main part of encoding frame of the gene, the primers were designed for cloning and gene expression of *gag* in the way that the amplified fragment could be cloned in different vectors such as cloning and expressing vectors.

Further the second goal of this study was to clone the above mentioned gene in each of the cloning vector (pTZ57R/T vector) and expressing vector (pGEX-4T-3). The cloning of this gene in the cloning vector after sequencing and comparing resulted sequences to other known sequences of the *gag* gene available in Genebank indicates the success in cloning the gene into the related vector. Besides such a vector have the capacity to be proliferated in the competent bacterial cells and to be digested due to several sites for restriction enzymes, and also to be extracted and to be inserted in the expressing vectors.

Moreover the *gag* gene product is an important viral antigen that induces a strong immune response in infected cattle. Recently, a purified recombinant BIV Gag protein was used in an immunoblot assay to detect BIV antibodies in field bovine serum samples. The method proved to be sensitive and specific by comparing the results with PCR (14).

As the amplified fragment by PCR involves all the domains of *gag* and has the capacity be placed in the expressing frame based on first designs of primers and has successfully been

cloned in the expressing vector of pGEX-4T-3 so, the expression of this gene and the preparing recombinant protein will be applied in near future for designing recombinant protein for detection of bovine immunodeficiency virus in Iran.

Besides, for sequencing of the *gag* gene and comparing its genetic diversity in the Iranian isolates with other available viruses in the world, we compared the known sequences of this gene in Genbank of NCBI. The results indicated that there was 0.4-10.6% genetic diversity in the fragment. Most of agreement was related to the known sequences in the *gag* gene in USA (NC001413) and most of differences was also related to strain of this virus in India (AY426724).

The phylogenetic tree of compared sequences was also drawn using ClustalX and Njplot softwares. Is clear from in figure 3, the Iranian isolate is set in the branch of American sequences and there is significant difference between them and the separated strain in India..

We are evident of not much diversity in the sequences of BIV in the other studies. Despite of little diversity in the sequences which are being studied, we can justify the genetic diversity of the

virus based on its geographical distribution. As the origins of many Iranian noble cattle's refer to the America, so the perceived genetic similarities in this research can justify this claim. Besides, transportation of livestock between Far-East Countries (Japan) and Iran basically does not have any noticeable historical background. Thus, placing of Indian strains in other branches of phylogenetic tree highlights differences in the sequence of this virus between Iran and the mentioned countries.

## References

1. [Van der Maaten MJ](#), [Boothe AD](#), [Seger CL](#). Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. [J Natl Cancer Inst](#). 1972; 49: 1649-1657.
2. [Snider TG](#), [Hoyt PG](#), [Jenny BF](#), [Coats KS](#), [Luther DG](#), [Storts RW](#), [Battles JK](#), [Gonda MA](#). Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle. [Vet Clin North Am Food Anim Pract](#). 1997; 13:151-176.
3. [Snider TG 3rd](#), [Luther DG](#), [Jenny BF](#), [Hoyt PG](#), [Battles JK](#), [Ennis WH](#), [Balady J](#), [Blas-Machado U](#), [Lemarchand TX](#), [Gonda MA](#). Encephalitis, lymphoid tissue depletion and secondary disease associated with bovine immunodeficiency virus in a dairy herd. [Comp Immunol Microbiol Infect Dis](#). 1996; 19:117-131.
4. [Gonda MA](#), [Braun MJ](#), [Carter SG](#), [Kost TA](#), [Bess JW Jr](#), [Arthur LO](#), [Van der Maaten MJ](#),. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to the human immunodeficiency virus. *Nature*. 1987; 330: 388-391.
5. [Garvey KJ](#), [Oberste MS](#), [Elser JE](#), [Braun MJ](#), [Gonda MA](#). Nucleotide sequence and genome organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology*. 1990; 175: 391-409.
6. [Oberste MS](#), [Gonda MA](#)). Conservation of amino-acid sequence motifs in lentivirus Vif proteins. *Virus genes*. 1992; 6: 95-102.
7. [Lechner F](#), [Machado J](#), [Bertoni G](#), [Seow HF](#), [Dobbelaere DA](#), [Peterhans E](#). Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *J Virol*. 1997; 71: 7488-7497.
8. [Turelli P](#), [Guiguen F](#), [Mornex JF](#), [Vigne R](#), [Quérat G](#). dUTPase- minus caprine arthritis-encephalitis virus is attenuated for pathogenesis and accumulates G-to-A substitutions. *J Virol*. 1997; 71: 4522-4530.

9. [Chen H](#), [Wilcox G](#), [Kertayadnya G](#), [Wood C](#)). Characterizations of the Jembrana disease virus *tat* gene and the cis-and trans-regulatory elements in its long terminal repeats. *J Virol* . 1999; 73: 658–666.
10. [Agnarsdóttir G](#), [Thorsteinsdóttir H](#), [Oskarsson T](#), [Matthíasdóttir S](#), [Haflidadóttir BS](#), [Andrésson OS](#), [Andrésdóttir V](#). The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *J Gen Virol*. 2000; 81: 1901–1905.
11. [Gonda MA](#), [Luther DG](#), [Fong SE](#), [Tobin GJ](#). Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and virus-host interactions. *Virus Res*. 1994; 32:155–181.
12. [St-Louis MC](#), [Cojocariu M](#), [Archambault D](#). The molecular biology of bovine immunodeficiency virus: a comparison with other lentiviruses. *Anim Health Res Rev*. 2004; 5: 125–143.
13. [Rasmussen L](#), [Battles JK](#), [Ennis WH](#), [Nagashima K](#), [Gonda MA](#). Characterization of virus-like particles produced by a recombinant baculovirus containing the gag gene of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology*. 1990; 178: 435–451.
14. [Zhang S](#), [Xue W](#), [Wood C](#), [Chen Q](#), [Kapil S](#), [Minocha HC](#). Detection of bovine immunodeficiency virus antibodies in cattle by western blot assay with recombinant gag protein. *J Vet Diagn Inves*. 1997; 9:347-351.
15. [Battles JK](#) , [Hu MY](#), [Rasmussen L](#), [Tobin GJ](#), [Gonda MA](#). Immunological characterization of the *gag* gene products of bovine immunodeficiency virus .*J Virol*. 1992; 66: 6868–6877.
16. [Tobin GJ](#), [Sowder RC 2nd](#), [Fabris D](#), [Hu MY](#), [Battles JK](#), [Fenselau C](#), [Henderson LE](#), [Gonda MA](#). Amino acid sequence analysis of the proteolytic cleavage products of the bovine immunodeficiency virus Gag precursor

- polypeptide. J Virol. 1994; 68: 7620–7627.
17. [Lillehoj EP](#), [Salazar FH](#), [Mervis RJ](#), [Raum MG](#), [Chan HW](#), [Ahmad N](#), [Venkatesan S](#). Purification and structural characterization of the putative gag-pol protease of human immunodeficiency virus. J Virol. 1998; 62: 3053-3058.

## Cloning and phylogenetic analysis of Bovine immunodeficiency virus *gag* gene in Iranian isolates

Elahe Tajbakhsh

Department of Biology, ShK.C., Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Corresponding author: ee\_tajbakshh@yahoo.com

### Abstract

Bovine immunodeficiency virus (BIV), a member of the family *Retroviridae*, genus *Lentivirus*, has three important genes namely *gag*, *pol* and *env*. In the first step, PCR product of *gag* gene of BIV, isolated in different regions of Iran, were cloned in to a pTZ57R/T vector; then insert were digested by *Bam*HI and *Xho*I restriction enzymes and then cloned in to pGEX-4T-3 as an expression vector. Analysis of the partial bovine immunodeficiency virus (BIV) *gag* gene sequences obtained from insert and was run. The Iranian BIV *gag* sequence was compared to 5 other corresponding sequences of BIV isolated in different countries. In the end, It was revealed that nucleotide analysis of the sequences witnessed, a variation of 0.4-10.6% and constructing phylogenetic tree revealed two clusters in it.

**Key words:** Bovine immunodeficiency virus, *gag* gene, pTZ57R/T vector, pGEX-4T-3 vector, Phylogenetic analysis



# رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۳ شماره ۱ بهار ۱۴۰۴

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



## شکلاتهای آنتی بیوتیکی هاریتاکی چورنا روشی شیرین تر برای درمان کودکان

Sukanya Jitendra Patil<sup>\*1</sup>, Rushikesh Shivaji Hingmire<sup>2</sup>, Sneha Shrikant Kavitate<sup>3</sup>, Pranali Manohar Pinage<sup>4</sup>, Priyanka Dinkar Hankare<sup>5</sup>.

<sup>1,2,4,5</sup> Assistant Professors, Govindrao Nikam College of Pharmacy, Sawarde 415606, Maharashtra. India.

<sup>3</sup> Lecturer, College of Pharmacy (Poly), Sawarde 415606, Maharashtra. India.

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخچه مقاله:</p> <p>دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۰۷</p> <p>پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۴</p> <p>چاپ: بهار ۱۴۰۴</p> <p>DOI:  <a href="https://doi.org/10.82415/NACMS.2025.1105813">https://doi.org/10.82415/NACMS.2025.1105813</a></p> <p>کلمات کلیدی:</p> <p>شکلات آنتی بیوتیکی، رویکرد گیاهی، عوارض جانبی کمتر، هاریتاکی، چورنا.</p>	<p>مطالعه حاضر با هدف فرمولاسیون شکلات دارویی، متشکل از هاریتاکی چورنا با اثر آنتی بیوتیکی انجام شد. طیف گسترده‌ای از آنتی بیوتیک‌ها در بازار برای درمان عفونت‌های مختلف باکتریایی و قارچی موجود است، اما هر کدام عوارض جانبی متعددی نیز دارند. کدام یک ممکن است در مورد بیماران کودک جدی باشد؟ از این رو نیاز به رویکرد جایگزین با عوارض جانبی کمتر ضروری است. فرمولاسیون ارائه شده این ضرورت را برآورده می‌کند داشتن هاریتاکی چورنا که اثر آنتی بیوتیکی نشان می‌دهد و منشأ گیاهی دارد، هیچ عارضه جانبی ندارد. هاریتاکی چورنا از نظر pH، مقدار خاکستر، مقدار استخراج محتوای فیبر خام، آلودگی فلزات سنگین و فعالیت ضد میکروبی تهیه و ارزیابی شد، اما خود چورنا به تنهایی رفتار نامطلوبی از خود نشان داد که منجر به مشکل عدم رعایت بیمار شد. این نقص با افزودن هاریتاکی چورنا به شکلات - محبوب‌ترین ماده غذایی در بین کودکان جبران شد. در ادامه، فرمولاسیون نهایی از نظر پارامترهای فیزیکی، ابعاد، تغییرات وزن و فعالیت ضد میکروبی ارزیابی شد.</p>

\* نویسنده مسئول: Email

sukanyapatil661@gmail.com



## Introduction

### Most Common Diseases in Paediatric

- Bronchitis
- Most ear infection (Otitis media)
- Sinus infection (Sinusitis)
- Sore throat/ Strep throat
- Urinary tract infection
- Pneumonia
- Nasty bacterial skin infections (impetigo)
- Common cold and Runny nose
- Influenza (Flu)

Above mentioned diseases in Paediatric is a result of either Bacterial infection or Viral infection. Most of them are due to Bacterial infection and can be treated by the use of Antibiotics, except Common cold, Runny nose and Influenza (1).

### Antibiotics

Antibiotics are substances used to treat bacterial and fungal illnesses. These are incredibly helpful medications that have helped several kids with life-threatening conditions like meningitis, pneumonia, and septicaemia (blood poisoning) survive. Antibiotics are also useful in treating common bacterial infections in children, such as skin and middle ear infections. Antibiotics are among the most useful medications we have when administered properly. Antibiotics, however, are only effective against bacterial and fungal

illnesses. They don't affect viruses in any way. Numerous illnesses, including common colds and some stomach disorders that result in diarrhoea, are virus-based and can only be eliminated by the body's defensive mechanisms (2). It is frequently impossible to distinguish between infections caused by viruses or bacteria. This is especially true when upper respiratory tract infections are present. These infections are fairly prevalent and can cause earaches, runny noses, coughing, and sore throats. Most kids will have between five and ten of these illnesses' year, especially in the beginning when they start interacting with lots of other kids. The length and severity of the sickness as well as the existence of any other aggravating conditions will all play a role in the decision to prescribe an antibiotic in these situations. In order to identify the specific germ causing the infection, tests can be required (3, 4).

### Right One Antibiotic

Physicians have a variety of antibiotics to select from. Some antibiotics are exclusive to a single type of bacterium, whereas others—referred to as "broad spectrum antibiotics" are effective against a large range of germs. The goal of treatment is to match the appropriate antibiotic to the most likely pathogen responsible for the illness. Antibiotic resistance makes

bacterial illnesses more difficult to treat when drugs are abused or misused. When bacteria adapt and change, antibiotics that were formerly effective against that type of bacteria become ineffective. This is known as antibiotic resistance (5, 6).

### Side Effects of Antibiotic

Antibiotics are not an exception to the rule that no medication is completely safe from adverse effects. When side effects do arise, though, they are often minor. It is diarrhoea that is most prevalent. Antibiotic allergies that are very severe are rare and often manifest as rashes. bloating and indigestion, diarrhoea, vomiting, nausea (feeling like you might throw up), stomach discomfort, lack of appetite, and many more side effects are the most frequent (7, 8). Ones caused by antibiotics. Usually minor, these side effects should go away when your therapy is over. One in fifteen persons experiences an allergic response to

antibiotics, particularly cephalosporins and penicillin. Usually mild to severe, the allergic response manifests as a raised, itchy skin rash known as urticarial, or hives, as well as coughing, wheezing, and tightness in the throat that can make breathing difficult. Antihistamines are often an effective treatment for these mild to severe allergic responses. Anaphylaxis is a severe allergic reaction that can be fatal in rare instances when an antibiotic is used. The above-mentioned symptoms are frequently the initial ones that occur first and can include a fast heartbeat, breathing difficulties brought on by swelling and tightness in the neck, an abrupt and intense feeling of dread and anxiety, a sharp and sudden drop in blood pressure that leaves you dizzy and confused, and even unconsciousness. Anaphylaxis is a medical emergency and can be life-threatening if prompt treatment is not given.

ANTIBIOTICS	SIDE EFFECTS
<b>Amoxicillin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Upset stomach</li> <li>• Diarrhoea</li> <li>• Vomiting</li> <li>• Rash</li> <li>• Nausea</li> </ul>
<b>Gentamicin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Loss of appetite</li> <li>• Injection site reactions (pain, irritation, and redness)</li> <li>• Mild diarrhoea</li> </ul>
<b>Ciprofloxacin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stomach ache</li> <li>• Watery bowel movements</li> </ul>

<b>Cefixime</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Constipation</li> <li>• Gas</li> <li>• Increased night-time urination</li> <li>• Loss of appetite</li> <li>• Diarrhoea and loose stools</li> </ul>
<b>Azithromycin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Abdominal pain</li> <li>• Rash</li> <li>• Indigestion</li> </ul>
<b>Cefdinir</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diaper rash in an infant taking liquid cefdinir</li> <li>• Itching</li> <li>• Vaginal itching or discharge</li> </ul>
<b>Cephalexin</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Joint pain</li> <li>• Stomach cramps and pain</li> </ul>
<b>Trimethoprim</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Watery bowel movements</li> <li>• Upset stomach, throwing up</li> </ul>

Table 1: Mostly Used Antibiotics in Paediatric and Their Side Effects

As use of above-mentioned allopathic Antibiotics leads to such number of side effects and can prove harmful to infants and children. So, instead of them use of Haritaki churna would prove beneficial to treat bacterial infections with not so severe and minimum side effects. Also, they are as potent as conventional antibiotics.

### Churna

According to Ayurveda, Churna is a mixture of powdered herbs and or minerals used in Ayurvedic medicine. After being individually ground, all of the ingredients are combined. Raj and Kshada are other names for Churna. Churnas come in a wide

variety, and each kind has a distinct market need (9).

### Haritaki (*Terminalia chebula*)

T. chebula is referred to as the "King of Medicine." Since it is believed to be sacred to God Siva (Hara) or to carry away all ailments, it is commonly known as "Haritaki." There are many intriguing synonyms for "Haritaki". *Terminalia chebula* is a flowering evergreen tree of the family Combretaceae. It has several common names such as black myrobalan, ink tree, or chebolic myrobalan (10, 11).

A medium- to large-sized, densely branching deciduous tree, *Terminalia chebula* may reach heights of up to 30

metres and girths of 1 to 1.5 metres. The elliptical leaves are 10–30 cm long, having a cordate base and a sharp apex. There are six to eight pairs of veins in the leaf vasculature. Located in short panicles or simple terminal spikes, the flowers are monoecious, short stalked, dull white to yellow, and have a strong, disagreeable scent. Fruits are yellowish-green, ovoid drupes that are 3-6 cm long and 1.3–1.5 cm wide, with one oval seed.

### Chocolates

Chocolate is a culinary preparation made from ground and roasted *Theobroma cocoa* beans that has a distinctively sweet taste and is usually scented with vanilla. It can be produced as a liquid, paste, block, or as flavouring for other desserts. With evidence of chocolate beverages reaching back to 1900 BC, the Mokaya (Mexico and Guatemala) are the people from whom the oldest uses are known to have originated. Actually, most people in Mesoamerica drank chocolate-flavoured drinks; this includes the Maya and Aztecs, who created a beverage called "bitter water" in Nahuatl. Chocolate is a very versatile and sophisticated food that can be used to create a wide range of flavour and texture experiences. Additionally, because chocolate is an anhydrous media, it resists the development of microorganisms and the hydrolysis of active ingredients that are sensitive to water. In many ways, chocolate

is an excellent delivery system for active ingredients. For instance, the organoleptic properties of chocolate work wonders in mitigating the unpleasant flavours associated with certain active agents and in imparting a smooth and even texture to otherwise unpleasantly grainy active agent. Delivering Haritaki compositions (12). Churna through chocolate-based dosage form will be an interesting approach to overcome the limitation associated with conventional therapies and also it will



Fig 1: *Haritaki* Fruits

bridge the gap of traditional and modern system of medicine. *Churnas* are traditionally acclaimed effective but there are no or less evident, hence to give a scientific background to all traditional claims, this study can be a supportive add on. As such *churna* preparations are not that much palatable to patients so to make it more palatable or patient friendly.

### Materials and Methods

## Drug Review

- **Plant Profile (Haritaki Gunakarmas)** A blooming evergreen tree in the Combretaceae family is *Terminalia chebula*. It is also known by a number of colloquial names, including chebulic myrobalan, black myrobalan, ink tree, and haritaki in Sanskrit and Bengali, harad in Hindi, harada in Marathi and Gujarati, Karkchettu in Telugu, and Kadukkaya in Tamil. *T. chebula* is referred to be the "King of Medicine" in Tibet. Since it is believed to be sacred to God Siva (Hara) or to carry away all ailments, it is commonly known as "Haritaki". Haritaki has a number of intriguing synonyms, including "pathya," which means that it clears obstructions from the body's channels and pathways; "abhaya," which means that it instills fearlessness; "amrta," which means ambrosia; "divya," which means a divine herb; "medhya," which means a nerve tonic; "pranada," which means life-saving; "jivaniya" which means a vitalizing herb; "vayahstha," which means one that

maintains youth and longevity;



Fig 2: Chocolate

"rasayana phala," which means a fruit, etc. According to Indian legend, this portion formed from the ambrosia (Amrita) droplets that fell to Earth after God Indra drank them (13-16).

### Biological Source

It consists of dried ripe fruits of *Terminalia chebula* Retz. Belonging to the family Combretaceae.

### Botanical Description (Taxonomy)

**Kingdom:** Plantae

**Division:** Magnoliophyta

**Class:** Magnoliopsida

**Order:** Myrtales

**Family:** Combretaceae

**Genus:** *Terminalia*

**Species:** *chebula*



Fig 3: Dried *Heritage* Fruits

### Habit and Habitat

With a height of up to 30 metres and a girth of 1-1.5 metres, *Terminalia chebula* is a

medium- to big, densely branching deciduous tree. The elliptic, 10-to 30-cm-long leaves have a cordate base and a sharp tip. Six to eight pairs of veins make up the leaves' vasculature. Simple terminal spikes or short panicles of flowers with short stalks, monoecious, dull white to yellow colour, and a strong, disagreeable scent are common. One oval seed is contained in the yellowish-green, ovoid, drupe fruits, which are 3-6 cm long and 1.3-1.5 cm wide. Clayey and shady soils are not the only conditions in which *T. chebula* may thrive. The trees may reach heights of up to 2000 metres above sea level, as well as temperatures between 0 and 17 degrees Celsius and annual rainfall of 100 to 150 centimetres. Nevertheless, chebula is native to Asia and may also be found in Pakistan, Yunnan, Tibet, Guangdong, and Guangxi region in China, as well as in Egypt, Nepal, Sri Lanka, Iran, and Turkey. It is found in India's deciduous woods in West Bengal, Uttar Pradesh, Andhra Pradesh, Kerala, Himachal Pradesh, and Karnataka.

#### Plant Fruits Varieties

There are seven varieties of *T. chebula* (haritaki) depending on the kind of fruit;

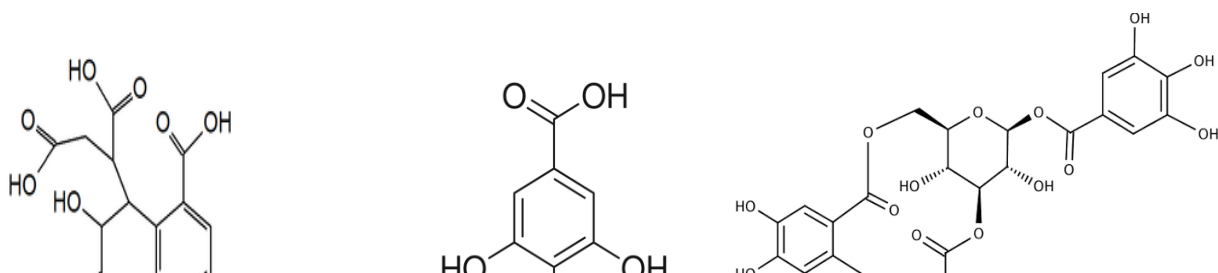
Vijaya is regarded as the finest.

- 1) Vijaya, in Vindhya, has an oval form.

- 2) Rohini: a spherical, ubiquitous plant.
- 3) Pototana, Sindh: compact and less voluminous.
- 4) Bulky Amruta- Champaranya.
- 5) Five lines represent eye problems on the Abhaya-Champadesha fruit.
- 6) Coloured in yellow, Jeevanti, Saurashtra.
- 7) Chetaki- found in the Himalayas- having three lines on it.

#### Chemical Constitution

32% of *T. chebula* is made up of tannin. *T. chebula* belongs to the pyrogallol (hydrolyzable) type and has 14 hydrolyzable tannin constituents (gallic acid, punicalagin, chebulanin, corilagin, neochebulinic, ellagic acid, chebulegic acid, chebulinic acid, 1,2,3,4,6,-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose, 1,6,-di-O-galloyl-D-glucose, casuarinin, 3,4,6-tri-O-galloyl-D-glucose and terchebulin). The diversity in geology affects the tannin concentration. Other chemicals that were recovered included phenolic compounds, triterpenoids, coumarin conjugated with gallic acid termed chebulin, and flavonol glycosides. Furthermore, *T. chebula* fruit was used to separate luteolin and ethyl gallate. Nutrients including protein, amino acids, and vitamin C are also included.



## Chebulic acid

**Therapeutic Uses:**

Because of its incredible healing abilities and broad variety of biological and pharmacological applications, *T. chebula* is known as the "King of Medicines" in Tibet. gastrointestinal motility enhancing and anti-ulcerogenic, hepatoprotective, cardioprotective, radioprotective, antidiabetic and radioprotective, antispasmodic, wound healing, purgative, immunomodulatory, and chemo preventive, among other properties.

**Collection of Haritaki fruits**

One of the biggest issues that researchers have when working with herbal compounds is sample collecting. It is exceedingly difficult to prevent the effects of habitat differences, collecting times, and geographical changes in the same species on the quality of the medication. In addition to these seasonal fluctuations, collecting

## Gallic acid

techniques also contribute to the problems that undermine the consistency of raw medication. All of these elements have an impact on the finished outcome, thus in a research project, these mistakes should be kept to a minimum. It is quite difficult to obtain pure samples of a single location that are gathered during the same season since market samples are frequently collected from several habitats and mixed together. Classics have noted that medications lose their efficacy after a year in their natural condition. All of these factors were taken into account when gathering fresh fruits. Ripe fruits that naturally fall from trees were gathered. Small, immature, and partly ripened fruits were not consumed. Additionally, mature fruits with worm indications or minor damage sustained after falling were not chosen. Approximately thirty fruits were gathered.

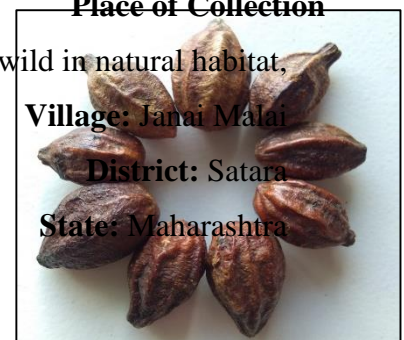
**Place of Collection**

Fruits were collected from the trees grown wild in natural habitat,

**Village:** Janai Malai

**District:** Satara

**State:** Maharashtra





NLatitude: 17.6501

ELongitude: 74.0329

Period of Collection:

Type of Soil: Laterite soil

C;Weather Conditions: Temperature: 20 + 10

Humidity: 60% + 20%

Fig 4: Collected *Haritaki* Fruits

### Authentication of raw material (Haritaki fruits)

The fresh fruits collected were further dried and authenticated to be *Terminalia chebula* by Head of the Botany Department of Lal Bahadur Shastri College, Satara.

### Organoleptic properties

- **Colour** - Intact fruit yellowish-brown.
- **Shape** - Ovoid.
- **Size** - 20-35 mm long, 13-25 mm wide, wrinkled and ribbed longitudinally, pericarp fibrous, 3-4 mm thick, non-adherent to the seed.

- **Taste** - Astringent (Kashaya Pradhan-five rasas).

### Selection of fruits (Prashasta Haritaki Lakshana)

All of the fruits that had been gathered were put through tests, such as Prashasta Haritaki Lakshanas, which Bhavaprakasha Nighantu described. The results were as follows,

- **New**  
Every fruit that was gathered when it was still fresh met this requirement.
- **Snigda**

Fruits that were dry and scaly were separated and not included for additional testing.



Fig 6: Fruits rejected in Snigda test

Fruits that were solidly hollowed out were discarded. This finding was connected to the appearance of worms in apples.



Fig 7: Fruits rejected in Ghana test



## • Vritta

Haritaki fruits came in a variety of forms, from round to oval, and with three to five ridges on them. In most cases, ridges were only partially apparent, and the number of ridges varied not just across plants but even between fruits on the same tree.



Fig 8: Vritta (Variety of fruits)

## Guru

Assessment was done with below mentioned submerging test.

## • Submerging in water

Every fruit that met the requirements was submerged in water. Fruits that floated were discarded, while those that sank in the water were collected for analysis. A few fruits were hanging in between; they were also left out of the research.



Fig 9: Guru (Submerging test)

## Weighing 2 karsha (~20gm)

The weight of the fruits varied greatly, ranging from 3 to 16 games. Fruits should weigh no more than 8 to 12 games, with certain exceptions. Although scriptures have said that the fruits of the two Karsha are Shrestha, these fruits were not present in the current investigation. Fruits weighing less than 6 games were discarded and not taken into consideration. Fruits weighing between 6 and 16 games that passed every test but two karsha weight were used to prepare the medication (14). Haritaki fruits which possess these qualities turned out to be 18 out of 30 and are termed as Shrestha which can be further used for preparation of Churna.

## Preparation of Haritaki Churna

Freshly picked Haritaki fruits that passed the Prasheettha Lakshana test were consumed (17):

- These fruits were then crushed using metallic Mortar and pestle to get coarse powder of fruits.
- Further the fine powder was obtained by grinding using mechanical grinder.
- The fine powder was then passed through the Sieve of mesh size 80 to get uniform particles.
- Then, the Churna was prepared and weighed. Packets weighing two grammes each were placed in zip-lock

bags after being weighed on an analytical balance to prevent dose

variations and ensure uniform pharmaceutical distribution. <sup>[14]</sup>



Fig 10: Haritaki churna

## CHURNA CHOCOLATES (MEDICATED CHOCOLATE)

### Determination of pH

The 1% pH Using a pH metre, the Churnas solution was ascertained.

### 1. Determination Of Ash Value

- **Total Ash Value:** In a silicon crucible that had been previously burned and tarred, two games of churna were precisely weighed. After that, the substance was ignited by progressively raising the heat to 500–600°C until it became white, signifying the lack of carbon. After cooling in a desiccator, the amount of total ash in milligrams per game of air-dried material is determined (18, 19).

## VALUATION OF HARITAKI

- **Acid Insoluble Ash Value:** After adding 25 millilitres of HCl to the crucible holding all of the ash and slowly boiling it for five minutes, around 5 millilitres of hot water were added and put into the crucible. A filter paper with less ash was used to gather the insoluble material. After that, the filter paper and the insoluble material were placed in a crucible and burnt to constant weight. The filtrate was then cleaned with hot water until it was neutral. After letting the residue cool, it was weighed.

### 2. Determination Of Extractive Value

- **Water Soluble Extractive Value**

Five games of churna were precisely weighed and then added to a conical flask with a glass stopper. It is then macerated for eighteen hours in 100 millilitres of chloroform water. After filtering, around 25 millilitres of the filtrate were placed in a China dish and dried over a water bath. After six hours of drying at 105°C, it was chilled and then weighed.

- **Alcohol Soluble Extractive Value**

The extraction process remained the same, however ethanol was utilised as the solvent instead of chloroform water.

### 3. Determination Of Crude Fibre Content

A round-bottom flask containing 2 games of precisely weighed churna was filled with 100 millilitres of 0.128 M sulphuric acid, refluxed for an hour, and then filtered through ash-free filter paper. The residue was then rinsed with water until the filtrate turned neutral. After that, the residue was weighed (a), burned to ash, and the weight of the ash (b) was calculated.

Based on dry weight, the difference between a and b indicated the crude fibre content.

### 4. Determination Of Heavy Metal Contamination

#### • Preparation Of Sample

##### Preparation of Churna solution

One gramme of churna was diluted with one hundred millilitres of distilled water to create the churna solution. This is used to do qualitative testing for mercury as well as limit tests for iron and lead as well as tests for arsenic levels.

#### • Arsenic Content

##### Preparation of Standard Solution (10PPM):

After dissolving 0.33 games of arsenic trioxide in 5 millilitres of 2M sodium

hydroxide solution, the mixture was diluted to 250 millilitres using water. After that, one litre was diluted with 100 volumes of water.

#### Procedure:

Pipetting out 10 millilitres of churna solution into a flask, followed by the addition of around 10 millilitres of concentrated nitric acid and drying on a water bath are the next steps. After drying the residue for thirty minutes at 130° C, 10 millilitres of hydrazine molybdate reagent were added, and the mixture refluxed for twenty minutes. Following cooling, the solution was tested using a UV spectrophotometer for absorbance at 800 nm in both the test and reference solutions.

#### • Limit Test for Iron

##### Preparation of Standard Solution (20 PPM):

Distilled water was used to dilute one volume of 0.1726% w/v ferric ammonium sulphate solution in 0.05 M sulphuric acid to ten litres.

#### Procedure:

In Nessler's cylinder, a limit test was run. Two millilitres of the test and reference solutions were placed in individual cylinders, followed by the addition of two millilitres of a 20% citric acid solution and 0.1 millilitre of thioglycolic acid. After mixing the mixture and adding iron-free ammonia, the solution was diluted to 50

millilitres using purified water. After allowing it to stand for five minutes, the sample's colour was compared to the standard colour. The sample was considered to fail the limit test if the colour generated during the test was greater than that of the standard solution, and to pass the test if the opposite happened.

#### a. Limit Test for Lead

**Preparation of Standard (20 PPM):**  
250 millilitres of water were created by dissolving 0.4 grammes of lead nitrate in 2 millilitres of nitric acid. Distilled water was used to dilute about one volume of the aforesaid solution to ten volumes.

#### **Procedure:**

In Nessler's cylinder, a limit test was conducted. One millilitre each of the test and standard lead solutions were placed in separate cylinders. The 25 millilitres of distilled water were then used to dilute the solutions to a volume of 35 millilitres. The pH was then adjusted to a value of 3–4 by adding diluted ammonia solution or acetic acid. Ten millilitres of freshly made hydrogen sulphide solution were added to each solution, combined, and diluted to fifty millilitres with water. After five minutes of standing, it was observed looking down over a white surface. If the colour generated in the test solution is not more vivid than that of the reference solution, the sample is said to have passed the lead limit test.

#### b. Test For Mercury

A white precipitate was obtained by adding 6M HCl to 10 drops of test solution. After that, a 6 M ammonia solution was used to treat the precipitate. There may be mercury present if the precipitate turns grey or black in colour.

### 5. Determination Of Microbial Content

The amount was adjusted to 100ml using the same medium after 1g of churna was dissolved in lactose broth. After adding around 10 millilitres of sample to 100 millilitres of MacConkey broth, the mixture was incubated at 43–45 degrees Celsius for 18–24 hours. On a plate containing MacConkey agar, a subculture was created and cultured for 18 to 24 hours at 43 to 45°C. The presence or absence of *Escherichia coli* is indicated by the formation of red, usually non-mucoid colonies of gram-negative rods that show as reddish zones.

### 6. Anti-Microbial Activity

The antimicrobial activity of Haritaki using ethanol solvent against strains of aerobic and anaerobic micro-organisms was evaluated by standard cup and plate method. The culture medium utilised for this nutrient is agar medium. We utilised pre-sterilized petri dishes to conduct an antibacterial test. We incubated the petri plates at 37°C for 24 hours. The aseptic

conditions were then maintained as the agar culture medium was evenly applied to the petri dish. To harden the agar medium, it is spread out, covered with a second petri plate, and refrigerated for a full day. Once this was done, the plates were taken out and cups were constructed on them. *Bacillus subtilis* and *E. coli* strains of microorganisms were evenly distributed on both plates in an aseptic environment. Gentamicin 1 ml of the standard solution was pipetted into one of the petri plates in the cups that were made, and Haritaki churna solution was pipetted into the other plate under aseptic conditions. Following that, 37°C was used to incubate these two plates for a full day. The inhibitory zones that developed on petri plates after the incubation time were measured (20).

## 7. Formulating Chocolate base

It was 50°C in the oven. Syrup was made by placing sugar and water in a beaker

and heating it for four to five minutes. After that, cocoa butter was taken and baked for one minute in a beaker. Following the removal of the sugar syrup from the oven, cocoa powder was added and thoroughly combined. Next, lecithin was added and well combined. The process of making chocolate is carefully monitored to make sure that the mixture's temperature is not too high. The chocolate foundation mixture above was then chilled to solidify. Here, additional flavour of vanilla essence was added in order to mask the strong odour of Cocoa powder and pungent smell of Lecithin. Also, when chocolates are properly solidified and are to be removed from the moulds, there is a possibility that the formulation would break during removal, which would cause the formulation to not shape properly. Dicalcium phosphate, an adsorbent, was thus added to the formulation to solve this issue (21).

SR. NO.	INGREDIENTS	CATEGORY	QUANTITY (gm)
1.	Cocoa powder	Principle Ingredient	12.50
2.	Cocoa butter	Solidifying agent	5.00
3.	Lecithin	Emulsifier	0.30
4.	Pharmaceutical grade sugar	Sweetening agent	10.00
5.	Vanilla essence	Flavouring agent	0.20
6.	Dicalcium phosphate	Adsorbent	2.00

Table 2: Formulation of Chocolate base

## 8. Formulation Of Haritaki Churna Chocolates (Medicated Chocolate)

I had the oven set to 50°C. Once the chocolate foundation was melted, it became a liquid that flowed freely. Following the previous stage, the necessary amount of medication—Hariti

churna—was added. The entire mass was then thoroughly mixed to guarantee even mixing with the aid of a stirrer. The aforementioned liquid was then transferred into a polycarbonate set mould and chilled for 15 minutes to solidify it. Subsequently, the chocolates are released from their mould and put through additional assessment procedures.

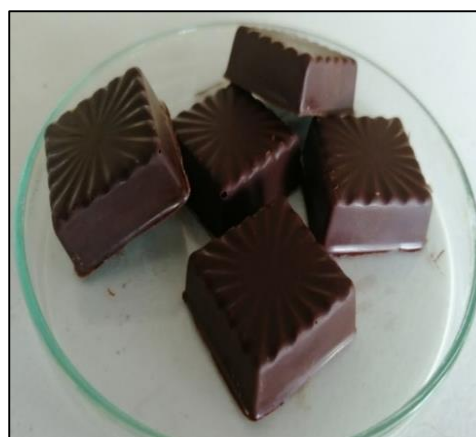


Fig 11: Formulation of Haritaki Churna Chocolates (Medicated

SR. NO.	INGREDIENTS	CATEGORY	QUANTITY (gm)
1.	Chocolate Base	Vehicle	
2.	Haritaki churna	API	2.00

Table 3: Formulation of Haritaki churna chocolates (Medicated Chocolate

## 9. Evaluation of Haritaki churna Chocolates

### • Colour, odour, taste, texture and mouth feel characteristics

This was evaluated by observing the chocolates and further administering them for taste and mouth feel characterisation (22).

### • Blooming Test

#### 1. Fat Bloom Test

The chocolate will become less glossy and develop a soft, white coating on the surface when a thin layer of fat crystals formed on the formulation, giving the end product an unappealing appearance. The migration of a filling fat to the chocolate layer or the recrystallization of

lipids are the two main causes of fat bloom. The onset of fat bloom will be postponed by storage at a steady temperature.

## 2. Sugar Bloom Test

Every Sample underwent treatment cycles that included,

- a. 30°C for 11hrs,
- b. Temperature shifting for 1 hr,
- c. 18°C for 11hrs, and

changing the temperature for an hour.

Whether or not blooming had taken place was determined by monitoring a test chocolate formulation for 11 hours at 18°C.

### • Dimensions

The Dimensions of five formulations was determined using Scale for length and width, And Vernier calliper for Thickness. The variation limit allowed is +5%.

### • Weight variation

Five formulations were chosen at random and weighed separately as part of a weight variation investigation conducted in accordance with USP. It was computed what the average weight and standard deviation were.

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1. Evaluation of Haritaki Churna

#### a. Physical Parameters

SR. NO.	PHYSICAL PARAMETERS	VALUES
1.	pH	5.357
2.	Ash values	
	a. Total ash value	10% w/w
	b. Acid insoluble ash	5% w/w
3.	Extractive values	
	a. Water soluble extractive value	0.12% w/w
	b. Alcohol soluble extractive value	2% w/w
4.	Crude fibre content	9.75% w/w

Table 4: Physical Parameters of Haritaki Churna

#### b. Detection of Heavy Metals

SR. NO.	HEAVY METALS	VALUES
1.	Arsenic (Spectrophotometry)	0.205 ppm
2.	Iron (Limit test)	Within the limit



3.	Lead (Limit test)	Within the limit
4.	Mercury (Qualitative analysis)	Absent

Table 5: Heavy Metals of Haritaki Churna)

**c. Detection of Microbes**

SR. NO.	MICROORGANISM	PRESENT/ABSENT
1.	<i>Escherichia coli</i>	Absent

Table 6: Detection of Microbes of Haritaki Churna

**d. Antimicrobial Test**

Zone of inhibition of Gentamicin (44 mm) was found to be slightly more than the Zone of inhibition due to *Haritaki churna* (40 mm).

Fig 12: *E. coli* plateFig 13: *Bacillus subtilis* plate**2. EVALUATION OF HARITAKI CHURNA CHOCOLATE****a. Physical Parameters**

Stability Study was carried out by keeping samples at room temperature for 1 month and results obtained are as followed,

SR. NO.	TEST	OBSERVATION	RESULT
1.	Colour	Dark Brown	No change
2.	Odour	Pleasant	No change
3.	Taste	Sweet	No change
4.	Texture	Smooth and Glossy	No change



5.	Mouth feel characterisation	Pleasant	No change
6.	Blooming tests:		
	Fat bloom test	No bloom	No change
	Sugar bloom test	No bloom	No change

Table 7: Physical Parameters of Haritaki Churna Chocolate

**b. Dimensions**

SR. NO.	LENGTH	WIDTH	THICKNESS
1.	2.4 cm	2.4 cm	1 cm
2.	2.4 cm	2.4 cm	1 cm
3.	2.4 cm	2.4 cm	1 cm
4.	2.4 cm	2.4 cm	1 cm
5.	2.4 cm	2.4 cm	1 cm
<b>Average</b>	<b>2.4 cm</b>	<b>2.4 cm</b>	<b>1 cm</b>

Table 8: Dimensions of Haritaki Churna Chocolate

**c. Weight Variation**

SR. NO.	WEIGHT OF CHOCOLATE
1.	8.85
2.	8.70
3.	8.65
4.	8.81
5.	8.78
<b>Average</b>	<b>8.75</b>

Table 9: Weight Variation of Haritaki Churna ChocolateAntimicrobial Test

Zone of inhibition due to *Haritaki churna* chocolate was found to be 40mm slightly less than that of standard Gentamicin antibiotic 46mm.

Fig 14: *E. coli* plateFig 15: *Bacillus subtilis* plate

### Conclusion:

The ancient science of life known as Ayurveda has a lengthy history, and its fundamental ideas could still hold true today. There has long been recognition of the need for Ayurvedic medicine to be collaborated with modern technology. But the fundamental component of all sciences is the ongoing pursuit of new information through investigation, advancement, and innovative applications. When designing dose forms, patient compliance and ease of administration are becoming increasingly crucial considerations. The creation of an attractive and patient-friendly medication administration system for pediatric and elderly patients has received more attention recently. Haritaki churna has proven to be similar in its antibacterial activity as compared to that of Gentamicin antibiotic. Different parameters were considered for the evaluation of the churna including pH,

ash value, extractive value, crude fibre content, heavy metal contamination, results of which navigated towards an acceptable formulation. After which the churna was incorporated in chocolate base and final formulation was then evaluated for physical parameters, dimensions, weight variation and antimicrobial activity. Final results indicated a formulation having antibiotic effect with few adverse actions and higher patient compliance.

### Acknowledgements

We would like to thank the management of Govindrao Nikam College of Pharmacy, Sawarde for providing access to the research facilities.

### Conflict Of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### Funding

None to declare.

## References:

1. Posfay-Barbe KM. Infections in Paediatrics: Old and New Diseases. Swiss Med. Wkly. 2012; 142; 1–10.
2. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic Resistance. J Infect Public Health. 2017; 10 (4): 369–378.
3. Hutchings M, Truman A, Wilkinson B, Antibiotics: Past, Present and Future. Curr. Opin. Microbiol. 2019; 51: 72–80.
4. Zhang J, Waite LM. Antibacteriano En Neumonía por aspiración. 2018; 2201–2213.
5. Elbers P, Girbes A, Malbrain MLNG, Bosman R. Right Dose, Right Now: Using Big Data to Optimize Antibiotic Dosing in the Critically Ill. Anaesthesiol Intensive Ther. 2015; 47 (5): 457–463.
6. Leibovici L, Shraga I, Andreassen S, Pauker SG, Rothberg M, Weinberg JR, Duerden BI., Drickamer MA. How Do You Choose Antibiotic Treatment? BMJ.1999; 12; 318 (7198):1614–1618.
7. Sarah E, Antibiotic Side Effects Explained. Chem. Eng. News Arch. 2013; 91 (21): 9-15
8. Bayarski Y. Antibiotics and Their Types , Uses and Side Effects. 1928; 6-17.
9. Osmanoglu, O. O. Comparing to Techniques Used in Customer Churn Analysis. *J. Multidiscip. Dev.* 2019, 4 (1), 30–38.
10. Aneja KR, Joshi R. Evaluation of Antimicrobial Properties of Fruit Extracts of Terminalia Chebula against Dental Caries Pathogens. Jundishapur J. Microbiol. 2009;2 (3): 105–111.
11. Eltayeb SAI, Ibrahim DAAM. Freeze Drying. World J Pharm Res. 2015; 4 (6): 96–111.
12. Verna R. The History and Science of Chocolate. Malays J Pathol. 2013; 35 (2): 111–121.
13. Rathinamoorthy R, Thilagavathi G. Terminalia Chebula - Review on Pharmacological and Biochemical Studies. Int J PharmTech Res. 2014; 6 (1): 97–116.
14. Klika KD, Saleem A, Sinkkonen J, Kähkönen M, Lopenen J, Tähtinen P, Pihlaja K. The Structural and Conformational Analyses and Antioxidant Activities of Chebulinic Acid and Its Thrice-Hydrolyzed Derivative, 2,4-Chebuloyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside, Isolated from the Fruit of Terminalia Chebula. Arkivoc 2004. 2004; (7): 83–105.
15. Mahesh R, Ramesh T, Nagulendran K, Velavan S, Begum H. Effect of Terminalia Chebula on Monoamine Oxidase and Antioxidant Enzyme

- Activities in Aged Rat Brain. Pharmacogn Mag. 2007; 3 (12): 240–244.
16. Gupta, P. C. Biological and Pharmacological Properties of Terminalia Chebula Retz. (Haritaki)-an Overview. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012, 4 (SUPPL.3), 62–68.
  17. Khan MRUZ, Yanase E, Trivedi V. Extraction, Phytochemical Characterization and Anti-Cancer Mechanism of Haritaki Churna: An Ayurvedic Formulation. *PLoS One* 2023; 18 (5):1–28.
  18. Kopparam M, Kumar TV, Anantha Narayana DB, Nandeesh R. Development of Hingwastak Churna Granules and Tablets by Dry Granulation Technique for Improving Patient Compliance. *Indian Drugs.* 2014; 51 (10): 23–28.
  19. Chamundeeswari D, Kanimozhi P, Reddy CU. Formulation and Evaluation of Churna for Digestive Property. *J Med.* 2007; 1–5.
  20. Gonelimali FD, Lin J, Miao W, Xuan J, Charles F, Chen M, Hatab SR. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1–9.
  21. Reddy S, Mounika K, Shalini S, Venkatesham A. Design and Fabrication of Medicated Chocolate Formulation by Chocolate Drug Delivery System. *J Curr Pharma Res.* 2017; 8 (1): 2255–2265.
  22. Sharma M, Jain DK. Chocolate Formulation As Drug Delivery System for Pediatrics. *Indonesian J Pharm.* 2019; 7 (4):133–139.

## ANTIBIOTIC HARITAKI CHURNA CHOCOLATES- A SWEETER WAY TO TREAT PAEDIATRIC

Sukanya Jitendra Patil<sup>\*1</sup>, Rushikesh Shivaji Hingmire<sup>2</sup>, Sneha Shrikant Kavitate<sup>3</sup>, Pranali Manohar Pinage<sup>4</sup>, Priyanka Dinkar Hankare<sup>5</sup>.

<sup>1,2,4,5</sup> Assistant Professors, Govindrao Nikam College of Pharmacy, Sawarde 415606, Maharashtra. India.

<sup>3</sup> Lecturer, College of Pharmacy (Poly), Sawarde 415606, Maharashtra. India.

Email:sukanyapatil661@gmail.com

### ABSTRACT:

The present study was aimed at formulating a medicated chocolate, comprising of Haritaki churna exhibiting antibiotic effect. There is wide range of antibiotics available in the market treating various bacterial and fungal infections, but each also comes with several side effects. Which may also turn out to be serious in the case of paediatric patients? Hence, a need of alternative approach with fewer side effects is necessary. The presented formulation fulfils this necessity; having Haritaki churna which shows antibiotic effect and being herbal originated shows no side effects. Haritaki Churna was prepared and evaluated for its pH, ash value, extractive value, crude fibre content, heavy metal contamination, and antimicrobial activity. But, the churna alone exhibited unpalatable behaviour leading to the problem of patient compliance. This drawback was compensated by incorporation of Haritaki churna in chocolate- the most loved food item among paediatrics. Following, final formulation was then evaluated for physical parameters, dimensions, weight variation and antimicrobial activity.

**Key Words:** Antibiotic chocolate, Haritaki, Churna, Herbal approach, Lesser Side-effects.



# رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۳ شماره ۱ بهار ۱۴۰۴

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



## مروری بر انواع روش‌های تهیه کیتوسان

شهریار صالحی

دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخچه مقاله: دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۳۰ چاپ: بهار ۱۴۰۴</p> <p>DOI: <a href="https://doi.org/10.82415/NACMS.2025.1212115">doi.org/10.82415/NACMS.2025.1212115</a></p> <p>کلمات کلیدی: کیتین، کیتوسان، روش اصلاح فیزیکی، روش اصلاح شیمیایی</p> <p>* نویسنده مسئول: <a href="mailto:shahriyarsalehi333@gmail.com">Email: shahriyarsalehi333@gmail.com</a></p>	<p>کیتین و کیتوسان به عنوان پلی ساکاریدهای طبیعی با ویژگی‌های خاص همچون زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و انحلال پذیری در محیط‌های اسیدی شناخته شده‌اند که از موجودات زنده مختلفی نظیر بندپایان و قارچ‌ها استخراج می‌شوند. کیتوسان از استیل‌زدایی کیتین مشتق می‌شود. این پلی ساکارید دارای قابلیت‌های ویژه‌ای برای جذب آلاینده‌ها و در نتیجه استفاده در صنایع مختلف است. همچنین میکروذرات کیتوسان به دلیل اندازه نانو و خواص جاذب بالای خود در تصفیه پساب‌ها و درمان‌های دارویی کاربرد فراوانی دارند. خواص فیزیکی و شیمیایی کیتوسان تحت تأثیر عواملی مانند درجه استیل‌زدایی، وزن مولکولی و شرایط فرآوری آن قرار می‌گیرد. روش‌های مختلفی برای استخراج کیتوسان از کیتین و تولید نانوذرات و میکروذرات آن و همچنین افزایش بهره‌وری آن وجود دارد که شامل روش‌های آنزیمی، شیمیایی و فیزیکی هستند. این مطالعه به بررسی ساختار، ویژگی‌ها و روش‌های تولید و اصلاح کیتوسان و کاربردهای آن پرداخته است.</p>

## مقدمه

زیست‌سازی، گرانروی، زیست‌تخریب‌پذیری و ویژگی‌های زیستی خاص نظیر خاصیت ضدباکتریایی و زیست‌چسبندگی می‌باشند (۷،۸).

### ویژگی‌های شیمی و فیزیکی کیتوسان

ساختار کیتوسان از اهمیت زیادی برخوردار است، زیرا بر ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی آن تأثیر می‌گذارد. ویژگی متمایز کیتوسان، درجه استیل‌زدایی و محتوای کم نواحی بلوری آن است. این ویژگی‌های مطلوب، کیتوسان را به گزینه‌ای مناسب برای کاربردهای متعدد علمی، مانند داروسازی و زیست‌فناوری، تبدیل کرده است. ویژگی‌های شیمی‌فیزیکی کیتوسان تحت تأثیر عواملی همچون درجه استیل‌زدایی، وزن مولکولی و روش‌های تجزیه آن قرار دارند (۹). منظور از درجه استیل‌زدایی، در واقع درصد تبدیل گروه‌های استیل در کیتین به گروه‌های آمین در کیتوسان است. همچنین کیتوسان بر اساس وزن مولکولی، در سطح تجاری به گروه‌هایی با وزن مولکولی بالا تا وزن مولکولی پایین تقسیم‌بندی می‌شود (۶).

### ویژگی ساختاری نانو کیتوسان

نانو کیتوسان ساختاری آب دوست، دارای ماهیت غیرسمی، زیست‌تخریب‌پذیر است. کیتوسان در اندازه نانو نسبت به اندازه میکرو برای فرایند جداسازی جذب کننده بهتری بوده و توانایی بالایی در حذف پساب‌های رنگ‌زدا دارند (۱۰).

### درجه استیل‌زدایی

درجه استیل‌زدایی اثر قابل توجهی بر انحلال‌پذیری کیتین دارد و با استفاده از ابزارها و روش‌های مختلف قابل اندازه‌گیری است. کیتوسان، به‌عنوان یکی از محصولات استیل‌زدایی‌شده و غیرسمی کیتین، در محلول‌های آبی اسیدی دارای قابلیت انحلال‌پذیری است (۱۱،۱۲). بررسی‌ها میان روش‌های متفاوت اندازه‌گیری درجه استیل‌زدایی کیتوسان نشان داده‌اند که این مقدار کاملاً به نوع روش تجزیه

## خصوصیات کیتین

کیتین از مهم‌ترین پلی‌ساکاریدهای طبیعی است که اولین بار در سال ۱۸۸۴ شناسایی شد. کیتین فراوان‌ترین زیست‌پلیمر طبیعی بعد از سلولوز است که به واسطه‌ی بسیاری از موجودات زنده ساخته می‌شود. شکل طبیعی کیتین به شکل میکروالیاف بوده و از اجزای ساختاری اسکلت خارجی بندپایان و دیواره سلولی قارچ‌ها تشکیل می‌شود. پلیمر کیتوسان، نتیجه حذف گروه استیل در کیتین است (۱-۳). به جهت استفاده از کیتین در زیست‌پزشکی این ترکیب به صورت معمول باید به مشتقات استیل‌زدایی شده آن مانند کیتوسان، تبدیل شود (۴).

### ساختار کیتین و کیتوسان

فرمول شیمیایی کیتین  $(C_8H_{13}O_5N)_n$  است که شباهت زیادی با سلولوز دارد، کیتوسان مشتق استیل‌زدایی شده آن است که می‌تواند درجه استیل‌زدایی زیادی داشته باشد (۵). در واقع تفاوت ساختار آن با سلولوز در این است که گروه هیدروکسید در موقعیت کربن شماره دو در سلولوز با گروه عاملی آمین در کیتوسان جایگزین شده‌است (۶).

### ویژگی‌های کیتوسان

کیتوسان به دلیل ویژگی بی‌همتای کاتیونی خود، در محیط اسیدی تمایل بالایی برای تشکیل پیوند با رنگ‌ها و یون‌های فلزی دارد و در نتیجه، در فرایند پاکسازی آلاینده‌های آبی، نسبت به دیگر پلیمرهای زیستی مانند سلولوز، پکتین، آگار و آگارز ترجیح داده می‌شود. علاوه بر این، کیتوسان به واسطه تبادل یونی و جاذبه الکترواستاتیکی، قادر است با رنگ‌ها و فلزات، کمپلکس‌های کی‌لیت تشکیل دهد. همچنین، درجه استیل‌شدن و وزن مولکولی از جمله ویژگی‌های اصلی کیتوسان هستند که بر سایر خواص آن تأثیر می‌گذارند. خواص کیتین و کیتوسان شامل انحلال‌پذیری،

## روش‌های پرکاربرد برای تهیه میکروذرات کیتوسان

سه روش پرکاربرد برای تهیه میکروذرات کیتوسان وجود دارد که عبارت اند از: ۱. روش‌های برپایه حذف حلال ۲. ایجاد اتصالات عرضی ۳. برپایه امولسیون سازی

**روش‌های برپایه حذف حلال:** محلول کیتوسان با استفاده از حلال مناسب تهیه می‌شود. میکروذرات کیتوسان بعد از تهیه با استفاده از عامل اتصال دهنده عرضی با روش تبخیر حلال از امولسیون جدا می‌شود. محلول به دست آمده از این روش را بدون به کاربردن اتصال دهنده عرضی می‌توان با روش‌های مختلف به قطره‌های ریز تبدیل کرد (۲۶).

**ایجاد اتصالات عرضی:** میکروذرات کیتوسان با این روش از طریق ایجاد اتصالات میان مولکول‌های پلیمر تشکیل می‌شوند که به دو دسته اتصال عرضی گرمایی و شیمیایی تقسیم می‌شوند (۲۶). در روش اتصال عرضی شیمیایی، تشکیل میکروذرات کیتوسان هم در محلول‌های تک‌فازی و هم دوفازی امکان‌پذیر است. مواد رایج مورد استفاده در این فرآیند، آنیون‌های چندظرفیتی مانند پلی‌فسفات‌ها، سولفات‌ها، گلوکارآلدئید و فرمالدهید هستند (۲۱).

**بر پایه امولسیون‌سازی:** امولسیون‌سازی یکی از پرکاربردترین روش‌های موجود برای تهیه میکروذرات کیتوسان است (۲۶). روش امولسیون‌سازی ساده بر اساس گروه‌های عاملی فعال موجود در زنجیره کیتوسان انجام می‌گیرد. به این معنا که محلول آبی حاوی کیتوسان در فاز غیرآبی پیوسته پراکنده می‌شود تا امولسیون آب در روغن حاصل شود. سپس محلولی حاوی عامل پایدارکننده برای تثبیت امولسیون به آن افزوده می‌شود. در ادامه، محلول حاوی عامل ایجادکننده اتصال عرضی به امولسیون اضافه می‌شود تا میکروذرات تشکیل شوند. در مرحله بعد، جداسازی و خشک‌کردن انجام می‌گیرد. در این روش، کنترل اندازه میکروذرات امکان‌پذیر است، اما به عواملی همچون نوع و

به‌کاررفته وابسته است. بنابراین، هنگام اشاره به درجه استیل زدایی کیتوسان، ذکر روش تجزیه به‌کاررفته کاملاً ضروری به نظر می‌رسد (۱۳).

## وزن مولکولی

توزیع وزن مولکولی کیتوسان با استفاده از روش رنگ نگاری مایع کارآمد (HPLC) و وزن مولکولی متوسط کیتین و کیتوسان از روش پراکنش نوری محاسبه می‌شود. گرانشی و سنجی یک روش ساده و سریع برای محاسبه وزن مولکولی است و معادله مارک هووینک رابطه میان وزن مولکولی کیتوسان و گرانشی ذاتی محلول را نشان می‌دهد (۱۶-۱۴).

## انحلال پذیری

انحلال‌پذیری کیتوسان علاوه بر درجه استیل زدایی، به توزیع گروه‌های استیل در طول زنجیره اصلی کیتوسان و وزن مولکولی آن وابسته است (۱۷). بررسی نقش پروتئین‌زدایی کیتوسان در مجاورت اسید استیک و اسید هیدروکلریک در انحلال‌پذیری نشان داد که درجه یونی‌شدن به pH و pKa اسید (۱۸) و همچنین به غلظت یونی محلول بستگی دارد. به همین دلیل، کیتوسان در pH کمتر از ۶ انحلال‌پذیر است (۱۹). بنابراین، می‌توان گفت انحلال‌پذیری پارامتر پیچیده‌ای است که کنترل آن دشوار بوده و به عوامل متعددی از جمله درجه استیل زدایی، ماهیت اسید استفاده‌شده، توزیع گروه‌های استیل در طول زنجیره کیتوسان و شرایط خشک‌کردن پلی‌ساکارید وابسته است (۲۰).

## میکروذرات کیتوسان

میکروذرات کیتوسان اغلب به شکل پودر، بسیار سبک با اندازه ۱-۱۰۰۰ μm است. سامانه‌های مبتنی بر میکرو ذرات کیتوسان کاربردهای وسیعی در مهندسی زیست پزشکی و دارویی داشته‌است (۲۱، ۲۲). این میکرو ذرات معمولاً ساختاری نامتخلخل دارند و تاکنون برای انتقال عوامل مختلف، مانند داروها، پروتئین‌ها و پادژن‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۳-۲۵).



همزدن ثابت در طول شب قرار گرفته و در آخر حلال آلی تبخیر شده و توده خشک و شفاف تشکیل می‌شود (۳۰،۳۱).

### روش شیمیایی

این روش رایج ترین روش در تولید صنعتی بوده و مواد خام همچون خرچنگ و پوست میگو برای بدست آوردن کیتین ، کلسیم زدایی ، پروتئین زدایی و رنگ زدایی شده سپس با NaOH بین ۴۰ تا ۵۰٪ مخلوط شده تا استیل حذف شود و کیتوسان حاصل گردد. استیل زدایی شیمیایی موجب صرف انرژی زیاد و آلودگی جدی زیست محیطی شده به همین دلیل روش آنزیمی روش کارآمدتری بوده و می‌تواند برای رفع معایب روش شیمیایی جایگزین این روش شود (۲۹).

### روش ژل ساز یونی

این روش بر پایه برهم‌کنش الکترواستاتیکی بین گروه‌های عاملی آمین در کیتوسان و گروه‌های فسفات با بار منفی موجود در سدیم تری‌پلی‌فسفات است که از شرایط ملایم‌تری استفاده می‌کند. معمولاً برای تهیه نانوذرات کیتوسان، در این روش، قطره‌قطره سدیم تری‌پلی‌فسفات به محلول بسپاری کیتوسان افزوده می‌شود، به‌طوری‌که ترکیب به‌صورت توده‌ای، آهسته و بدون واپاشی صورت می‌گیرد. هرچند این روش ایمن محسوب می‌شود، اما ذراتی با بارهای متغیر در محدوده ی ۲۵+ تا ۵۴+ تولید می‌کند. سدیم تری‌پلی‌فسفات، در واقع، یک نمک سدیم با بار منفی است که در برهم‌کنش با کیتوسان شرکت می‌نماید (۳۰،۳۲).

### اصلاح کیتوسان

کیتوسان به‌صورت خام برای جذب رنگ و سایر آلاینده‌ها مناسب است، اما به دلیل استحکام مکانیکی پایین و امکان پروتون‌دار شدن گروه‌های عاملی، کاربرد عملی مطلوبی ندارد. به همین دلیل، کیتوسان مورد اصلاح قرار می‌گیرد تا تمایل آن به آلاینده‌ها، استحکام مکانیکی، مقاومت حرارتی و مقاومت شیمیایی بهبود یابد. این اصلاحات به دو صورت

غلظت اتصال‌دهنده عرضی، سرعت همزن و اندازه قطرات بستگی دارد. با این حال، از جمله مشکلات این روش می‌توان به دشواری در جداسازی مواد واکنش‌نداده اشاره کرد. مواد رایج مورد استفاده در این روش نیز شامل گلو تارآلدئید و اسید سولفوریک هستند که به‌عنوان عوامل اتصال‌دهنده عرضی عمل می‌کنند (۲۷،۲۱).

### انواع روش تهیه کیتوسان از کیتین

کیتین از منابع سخت پوستان، نرم تنان، دیوار سلول قارچ‌ها و اسکلر حشرات به دست می‌آید. کیتین به دست آمده از این منابع اولیه به دلیل سطح بالای گروه استیل، ساختار بلوری سخت و حلالیت کم در محلول آبی کاربرد محدودی دارد به همین دلیل با حذف جزئی گروه استیل کیتین می‌توان میزان حلالیت در آب، خاصیت زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری آن را افزایش داد (۶،۲۸). برای تهیه کیتوسان از کیتین از روش های آنزیمی، ریشال معکوس، ژل ساز یونی و شیمیایی استفاده می‌شود.

### روش آنزیمی

در روش استیل زدایی آنزیمی با استفاده از آنزیم کیتین داستیلاز کیتین به کیتوسان تبدیل می‌شود. در این روش در مصرف انرژی صرفه جویی شده و همین طور از محیط زیست هم محافظت به عمل می‌آید. از مشکلات این روش می‌توان به دشواری کشت باکتری آلی تولید کننده آنزیم و استخراج آنزیم اشاره کرد زیرا انتخاب سویه مناسب میزان تولید کیتین داستیلاز با دوام بالا را افزایش می‌دهد که کاربرد ارزشمندتری دارد (۲۹).

### روش ریشال معکوس

این روش به تشکیل نانوذراتی با اندازه کوچکتر از ۱۰ nm کمک می‌کند. این روش به کمک استفاده از مخلوط پایدار ترمودینامیک آب ، ماده سطح فعال چربی دوست، روغن و آب انجام می‌شود. محلول سطح فعال در یک حلال آلی تهیه شده که در آن محلول کیتوسان به همراه دیگر مواد فعال تحت

شیمیایی و فیزیکی انجام می‌گیرد. معمولاً این فرآیند از طریق اصلاح زنجیره بسپاری صورت می‌پذیرد، به این معنا که طول زنجیره بسپاری افزایش یافته و حالت بلوری کاهش می‌یابد تا مکان‌های جذب، در دسترس‌تر و متناسب با کاربرد مورد نظر شوند (۳۳).

### روش اصلاح فیزیکی

با پیشرفت روز افزون علم، اعمال تغییرات فیزیکی کیتوسان به طور قابل توجهی لازم است. تغییر فیزیکی کیتوسان از پودر به حالت‌هایی همچون: الباف، فیلم و غشا انجام می‌شود که ویژگی‌های مکانیکی، مساحت سطح و موقعیت جذب آن را بهبود می‌بخشد (۳۴).

### روش آمیختن

این روش رویکردی امیدوارکننده برای تولید جاذب‌های زیستی با ویژگی‌های مطلوب و کاربردهای زیست محیطی است. در این روش، ترکیب سایر بسپارها با آرایه‌های کیتوسان باعث ایجاد قابلیت‌های جدیدی مانند استحکام مکانیکی بالا، افزایش ظرفیت و انتخاب پذیری جذب، و بهبود تخلخل می‌شود که عملکرد کیتوسان را ارتقا می‌دهد (۳۵).

### آسیاب مکانیکی

این روش دارای قابلیت است که نانو ساختارهایی با یکنواختی بسیار بالا تولید کند. این روش بر ویژگی مکانیکی تاثیر گذاشته و ساختار یک پارچگی را نیز بهبود می‌بخشد. در این روش ساخت مواد چند سازه‌ای با خصوصیت همگن در مدت کوتاهی انجام می‌گردد که باعث حفظ کیفیت مواد شده است (۳۶).

### روش اصلاح شیمیایی

کیتوسان نوعی ماده طبیعی است که به‌طور وسیع در طبیعت وجود دارد. با این حال، منابع کیتوسان موجود در آب نامحلول بوده، مقاومت کمی در برابر اسید داشته و از نظر مکانیکی نیز استحکام کافی ندارند. به همین دلیل، اصلاح کیتوسان باید به‌گونه‌ای انجام گیرد که استفاده از منابع آن

به‌صورت معقول و با کاربردی وسیع و گسترده امکان‌پذیر باشد. اصلاح شیمیایی یکی از این روش‌هاست که با هدف افزایش گستردگی کاربرد کیتوسان، بهبود حلالیت و ارتقاء توانایی‌های شیمی فیزیکی آن مانند پایداری گرمایی، مقاومت در برابر اکسید شدن و افزایش خاصیت ضدباکتریایی صورت می‌گیرد. در اصلاح شیمیایی، فرآیندهایی به کار می‌روند که باعث بهبود ویژگی‌های شیمیایی و زیستی کیتوسان می‌شوند. همچنین این نوع اصلاح می‌تواند سامانه‌های مکمل را فعال کرده و بسته به نوع کاربرد نهایی، عملکرد فعال‌کننده‌های پلاکت را ارتقاء بخشد (۳۷).

### کربوکسیل دار شدن

کربوکسیل دار شدن کیتوسان به این جهت است که گروه‌های اسیدی را به زنجیره‌های اصلی کیتوسان وارد کند. این کار برای بهبود حلالیت، مرطوب کنندگی و گسترش فیلم و گسترده کردن کاربرد های کیتوسان انجام می‌گردد (۶).

### پیوند زدن گروه‌های عاملی

پیوند زدن شامل ایجاد پیوندهای کووالانسی با گروه‌های عاملی است، به این معنا که این فرآیند موجب افزایش توانایی جذب یون‌های فلزی می‌شود. کیتوسان به‌خودی‌خود دارای ظرفیت بالایی برای جذب مواد است، اما به‌دلیل دارا بودن تعداد زیادی گروه عاملی در ساختار خود، به‌راحتی قابل اصلاح با گروه‌های پیوند زننده است که این اصلاح، اثر جذب کیتوسان را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد (۳۸، ۳۹). همچنین بسته به نوع کاربرد، انواع مختلفی از گروه‌های پیوندی برای انتخاب وجود دارد. پیوند زدن کیتوسان معمولاً از طریق فرایندهایی مانند آلکیل‌دار کردن، تیول‌دار کردن، سولفات‌دار کردن، فسفریله کردن، آسیل‌دار کردن و اتری کردن انجام می‌شود (۴۰).

### پیوند عرضی

یکی از ضعف‌هایی که کاربرد کیتوسان را محدود می‌کند، استحکام مکانیکی پایین و پایداری شیمیایی ضعیف آن است.

گزینه‌ای مناسب برای استفاده در سامانه‌های نوین جذب آلاینده‌ها و دارورسانی هدفمند تبدیل کرده است.

کیتوسان در محیط‌های اسیدی محلول بوده و بنابراین برای پساب‌هایی با pH بالا بی‌اثر است. همچنین به دلیل استحکام مکانیکی پایین، استفاده مجدد از کیتوسان با دشواری همراه است (۴۱).

پیوند عرضی یکی از پرکاربردترین روش‌های اصلاح برای بهبود استحکام مکانیکی و پایداری شیمیایی کیتوسان در محلول‌های اسیدی است. این روش معمولاً همراه با سایر روش‌های اصلاحی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در پیوند عرضی، زنجیره‌های کیتوسان از طریق پیوندهای یونی یا کووالانسی به یکدیگر متصل می‌شوند. در واقع، پیوندهای با واکنش با گروه‌های عاملی موجود در ساختار کیتوسان، نقش پل بین‌زنجیره‌ای را ایفا می‌کنند. در این روش، هر مولکول پیونددهنده باید حداقل دارای دو گروه عاملی باشد (۴۲، ۴۳).

### نتیجه‌گیری

کیتوسان به‌عنوان یک پلیمر زیستی طبیعی، به دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فردی مانند زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، و توانایی در جذب یون‌های فلزی و مواد رنگ‌زا، در زمینه‌های مختلف زیست‌محیطی، دارویی و بیوتکنولوژیکی کاربرد گسترده‌ای دارد. با این حال، محدودیت‌هایی مانند انحلال‌پذیری پایین در pH بالا، استحکام مکانیکی ضعیف و پایداری شیمیایی محدود، استفاده عملی از آن را با چالش‌هایی مواجه کرده است. برای رفع این محدودیت‌ها، اصلاحات فیزیکی و شیمیایی متعددی بر روی کیتوسان اعمال می‌شود. روش‌هایی نظیر پیوند زدن گروه‌های عاملی، پیوند عرضی، و تغییر در ساختار زنجیره‌ای، منجر به بهبود خواصی چون پایداری حرارتی، مقاومت در برابر اکسید شدن، خاصیت ضدباکتریایی و قابلیت جذب بیشتر می‌شوند. در مجموع، اصلاح ساختاری کیتوسان موجب توسعه کاربردهای صنعتی و علمی آن شده و این پلیمر طبیعی را به

## مراجع

- (1). Anitha A, Sowmya S, Kumar PS, Deepthi S, Chennazhi KP, Ehrlich H. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2014; 39(9):1644-1667.
- (2). Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science.* 2006; 31(7):603-32.
- (3). Pillai CK, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in polymer science.* 2009; 34(7):641-78.
- (4). Ke CL, Deng FS, Chuang CY, Lin CH. Antimicrobial actions and applications of chitosan. *Polymers.* 2021; 13(6):904.
- (5). Shahidi F, Arachchi JK, Jeon YJ. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science & technology.* 1999; 10(2):37-51.
- (6). Kordi M, Farokhi N. An overview of the applications of chitin and chitosan in different industries, *Human & Environment,* (2024) 21(3), 133-142
- (7). Qamar SA, Ashiq M, Jahangeer M, Riasat A, Bilal M. Chitosan-based hybrid materials as adsorbents for textile dyes—A review. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering.* 2020; 2:100021.
- (8). Zargar V, Asghari M, Dashti A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng reviews.* 2015; 2(3):204-26.
- (9). Ghosh A, Ali MA. Studies on physicochemical characteristics of chitosan derivatives with dicarboxylic acids. *Journal of Materials Science.* 2012; 47:1196-204.
- (10). Hu W, Li L, Su M. Spatial inequity of multi-level healthcare services in a rapid expanding immigrant city of China: a case study of Shenzhen. *International journal of environmental research and public health.* 2019; 16(18):3441.
- (11). Raymond L, Morin FG, Marchessault RH. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. *Carbohydrate Research.* 1993; 246(1):331-6.
- (12). Bagheri-Khoulenjani S, Taghizadeh SM, Mirzadeh H. An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. *Carbohydrate Polymers.* 2009; 78(4):773-8.
- (13). Taghizadeh SM, Takrousta M, Davari G, Yousefi M. "Preparation of Chitosan with Difeerrent Degrees of Deacetylation And Comparison Of Its Different Characterization Methods. 2005: 291-297.
- (14). Wu AC, Bough WA, Conrad EC, Alden Jr KE. Determination of molecular-weght distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* 1976; 128(1):87-99.
- (15). Kumar MN. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers.* 2000; 46(1):1-27.
- (16). Taghizadeh SM, Davari G. Preparation, characterization, and swelling behavior of N-acetylated and deacetylated chitosans. *Carbohydrate polymers.* 2006; 64(1):9-15.
- (17). Tokura S, Nishi N, Noguchi J. Studies on chitin. III. Preparation of chitin fibers. *Polymer Journal.* 1979; 11(10):781-6.
- (18). Rinaudo M, Pavlov G, Desbrieres J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer.* 1999; 40(25):7029-32.
- (19). Rinaudc M, Pavlov G, Desbrieres J. Solubilization of chitosan in strong acid medium. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization.* 1999; 5(3):267-76.

- (20). Cho J, Heuzey MC, Bégin A, Carreau PJ. Physical gelation of chitosan in the presence of  $\beta$ -glycerophosphate: the effect of temperature. *Biomacromolecules*. 2005; 6(6):3267-75.
- (21). Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International journal of pharmaceutics*. 2004; 274(1-2):1-33.
- (22). Mitra A, Dey B. Chitosan microspheres in novel drug delivery systems. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2011; 73(4):355.
- (23). Denkbaz EB, Odabasi M, Kiliçay E, Özdemir N. Human serum albumin (HSA) adsorption with chitosan microspheres. *Journal of applied polymer science*. 2002; 86(12):3035-9.
- (24). Sun Y, Liu Y, Liu W, Lu C, Wang L. Chitosan microparticles ionically cross-linked with poly ( $\gamma$ -glutamic acid) as antimicrobial peptides and nitric oxide delivery systems. *Biochemical Engineering Journal*. 2015; 95:78-85.
- (25). Guliyeva Ü, Öner F, Özsoy Ş, Hazirolu R. Chitosan microparticles containing plasmid DNA as potential oral gene delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006; 62(1):17-25.
- (26). Taghizadeh S, Sadeghi M, Ganji F. Chitosan and Its Microparticles as Carriers in Drug Delivery Systems: An Overview, *Polymerization*, 2017; 6(4): 4-19.
- (27). Varshosaz J. The promise of chitosan microspheres in drug delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*. 2007; 4(3):263-73.
- (28). Sivaramakrishna D, Bhuvanachandra B, Mallakuntla MK, Das SN, Ramakrishna B, Podile AR. Pretreatment with KOH and KOH-urea enhanced hydrolysis of  $\alpha$ -chitin by an endo-chitinase from *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*. *Carbohydrate polymers*. 2020; 235:115952.
- (29). Wang W, Xue C, and Mao X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020; 164:4532-46.
- (30). Kashyap PL, Xiang X, Heiden P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International journal of biological macromolecules*. 2015; 77:36-51.
- (31). Sheikholeslami ZS, Salimi-Kenari H, Imani M, Atai M, Nodehi A. Exploring the effect of formulation parameters on the particle size of carboxymethyl chitosan nanoparticles prepared via reverse micellar crosslinking. *Journal of microencapsulation*. 2017; 34(3):270-9.
- (32). Kamat V, Marathe I, Ghormade V, Bodas D, Paknikar K. Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles and in situ drug loading using active microreactor. *ACS applied materials & interfaces*. 2015; 7(41):22839-47.
- (33). Wang J, Zhuang S. Removal of various pollutants from water and wastewater by modified chitosan adsorbents. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2017; 47(23):2331-86.
- (34). Zhang L, Zeng Y, Cheng Z. Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review. *Journal of Molecular Liquids*. 2016; 214:175-91.
- (35). Upadhyay U, Sreedhar I, Singh SA, Patel CM, Anitha KL. Recent advances in heavy metal removal by chitosan based adsorbents. *Carbohydrate Polymers*. 2021; 251:117000.
- (36). Yoshida A, Miyazaki T, Ishida E, Ashizuka M. Preparation of bioactive chitosan-hydroxyapatite nanocomposites for bone repair through mechanochemical reaction. *Materials transactions*. 2004; 45(4):994-8.
- (37). Azmy EA, Hashem HE, Mohamed EA, Negm NA. Synthesis, characterization, swelling and antimicrobial efficacies of chemically

modified chitosan biopolymer. *Journal of Molecular Liquids*. 2019; 284:748-54.

(38). Wang J, Chen C. Chitosan-based biosorbents: modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides. *Bioresource technology*. 2014; 160:129-41.

(39). Rocha LS, Almeida Â, Nunes C, Henriques B, Coimbra MA, Lopes CB, Silva CM, Duarte AC, Pereira E. Simple and effective chitosan based films for the removal of Hg from waters: Equilibrium, kinetic and ionic competition. *Chemical Engineering Journal*. 2016; 300:217-29.

(40). Elsabee MZ, Morsi RE, Fathy M. Chitosan-oregano essential oil blends use as antimicrobial packaging material. In *Antimicrobial food packaging 2016* (pp. 539-551). Academic Press.

(41). Sutirman ZA, Rahim EA, Sanagi MM, Abd Karim KJ, Ibrahim WA. New efficient chitosan derivative for Cu (II) ions removal: characterization and adsorption performance. *International journal of biological macromolecules*. 2020; 153:513-22.

(42). Filipkowska U, Jóźwiak T, Szymczyk P. Application of cross-linked chitosan for phosphate removal from aqueous solutions. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. 2014(19):5-14.

(43). Vakili M, Deng S, Li T, Wang W, Wang W, Yu G. Novel crosslinked chitosan for enhanced adsorption of hexavalent chromium in acidic solution. *Chemical Engineering Journal*. 2018; 347:782-90.

## **Review of the Properties of Different Chitosan Preparation Methods**

**Shahriar Salehi**

Master's student, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University,  
Shahrekord, Iran  
[shahriarsalehi333@gmail.com](mailto:shahriarsalehi333@gmail.com)

### **Abstract:**

Chitin and chitosan are natural polysaccharides known for their unique properties such as biocompatibility, biodegradability, and solubility in acidic environments. They are extracted from various living organisms, including arthropods and fungi. Chitosan, as an acetylated derivative of chitin, possesses special capabilities for adsorbing pollutants and is widely used in various industries. The physical and chemical properties of chitosan are influenced by factors such as degree of deacetylation, molecular weight, and processing conditions. Several methods exist for extracting chitosan from chitin and enhancing its properties, including enzymatic, chemical, and physical approaches. Additionally, chitosan microparticles, due to their nanoscale size and high adsorption properties, have extensive applications in wastewater treatment and pharmaceutical treatments. This review article examines the structure, properties, production methods, and modifications of chitosan and its various applications.

**Keywords:** Chitin, Chitosan, Physical Modification Method, Chemical Modification Method



# رهیافتهای نوین در علوم سلولی و مولکولی

JNACMS

دوره ۳ شماره ۱ بهار ۱۴۰۴

Journal homepage: <https://sanad.iau.ir/journal/nacms>



## افزایش بیان همزمان PVT1 و MYC در بافت توموری پستان بیماران ایرانی: شواهد

### تقویت شده‌ای از ارتباط lncRNA ها با انکوژن های مجاور

یوسف رضا رضایی ملک<sup>۱</sup>، محمد شفیع<sup>۲</sup>، رضا طبری پور<sup>۳\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

۲. عضو هیأت علمی گروه ژنتیک، دانشکده فناوری های نوین علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

#### اطلاعات مقاله

#### چکیده

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۱۵

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۶

چاپ: بهار ۱۴۰۴

DOI:

[doi.org/10.82415/NACMS.2025.1214215](https://doi.org/10.82415/NACMS.2025.1214215)

کلمات کلیدی:

سرطان پستان، lncRNA، MYC، PVT1

\* نویسنده مسئول: Email

[tabaripoor@gmail.com](mailto:tabaripoor@gmail.com)

سرطان پستان به عنوان شایع ترین نئوپلاسم بدخیم زنان در جهان، به ویژه با روند افزایشی بروز در سنین پایین تر، یکی از چالش های اصلی سلامت عمومی به شمار می رود. با وجود پیشرفت های قابل توجه، بسیاری از جنبه های سلولی، مولکولی و ژنتیکی مرتبط با توموریز و پیشرفت سرطان پستان همچنان ناشناخته باقی مانده و شناسایی آن ها می تواند زمینه ساز توسعه روش های نوین تشخیصی و درمانی شود. در سال های اخیر، RNA های غیررمزگذار بلند (lncRNA) به عنوان تنظیم کننده های کلیدی بیان ژن و فرایندهای سلولی، به ویژه در سرطان، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته اند؛ یکی از این lncRNA ها، PVT1 است که در کنار انکوژن مجاور خود یعنی MYC، در ناحیه 8q24 کروموزوم ۸ قرار دارد. در حالی که نقش انکوژن MYC در پاتوژنز و پیشرفت سرطان پستان به خوبی اثبات شده است، ارتباط عملکردی آن با PVT1 و تأثیر همزمان این دو ژن بر فرایندهای سرطانی هنوز به طور کامل مشخص نشده است. این مطالعه با هدف بررسی بیان همزمان ژن های MYC و PVT1 در نمونه های بافت توموری و غیر توموری پستان زنان ایرانی انجام شد. برای این کار پس از استخراج RNA، سنتز cDNA و کمی سازی بیان ژن ها با روش RT-qPCR، داده ها به صورت آماری با نمونه های غیر توموری همان بیماران مقایسه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد بیان MYC و PVT1 به ترتیب ۲/۷۰ برابر ( $p=0.001$ ) و ۱/۲۴ برابر ( $p=0.048$ ) در نمونه های توموری نسبت به بافت سالم حاشیه تومور افزایش معنی داری دارد. همچنین، ارتباط مثبت و معنی داری بین بیان PVT1 و MYC مشاهده شد ( $p<0.01$ ;  $r=0.459$ ). یافته های این پژوهش برای نخستین بار افزایش بیان ژن های MYC و PVT1 را در بافت توموری سرطان پستان زنان ایرانی نشان می دهد. این نتایج، شواهد نقش MYC و PVT1 را در پاتوژنز و احتمالاً مقاومت دارویی این بیماری پررنگ تر می سازد و می تواند مسیر تحقیقات آینده را برای توسعه نشانگرهای زیستی و درمان های هدفمند مبتنی بر RNA های غیررمزگذار هموارتر کند.



## مقدمه

مولکولی، برای توسعه غربالگری هدفمند و ارتقای مراقبت‌های فردمحور در مدیریت سرطان پستان در سطح ملی و بین‌المللی ضرورت زیادی دارد (۳).

lncRNAها مولکول‌های غیرکدکننده‌ای با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که تنظیم دقیق بیان ژن و فرایندهای سلولی را از طریق مکانیسم‌های متنوعی از جمله تغییرات اپی‌ژنتیکی، کنترل در حین رونویسی و فرایندهای پسارونویسی به‌عهده دارند (۴). از منظر بالینی، تغییرات بیان lncRNAها در طیف وسیعی از بیماری‌ها مشاهده می‌شوند. در سرطان، lncRNAهایی مانند PVT1، HOTAIR و MALAT1 به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی تومورزایی، متاستاز و مقاومت دارویی شناخته شده‌اند و در سرطان‌های پستان، ریه، کولورکتال، پروستات و دستگاه گوارش به‌عنوان نشانگرهای زیستی با قابلیت تشخیصی و پیش‌آگهی مطرح هستند (۵، ۶). بدلیل نقش‌های گسترده و حیاتی lncRNAها در انواع بیماری‌های انسانی، این مولکول‌ها به‌عنوان اهداف درمانی نوین و نشانگرهای زیستی دقیق در پزشکی شخصی‌سازی‌شده مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند و امکان توسعه راهکارهای تشخیصی و درمانی نوآورانه را فراهم می‌کنند (۴).

lncRNAها در سرطان پستان نیز نقش‌های متنوع و پیچیده‌ای دارند و بر اساس ساختار و موقعیت ژنومی به انواع سنس، آنتی‌سنس، بین‌ژنی، داخل‌ژنی و متصل به پیش‌برنده تقسیم می‌شوند. برای نمونه، lncRNA سنس LINC00511 با افزایش بیان، موجب رشد سلول‌های سرطانی و مقاومت به شیمی‌درمانی می‌شود، lncRNA آنتی‌سنس ANRIL (با تنظیم بیان ژن‌های کلیدی مسیرهای آپوپتوز و چرخه سلولی، نقش سرکوبگر توموری دارد)، lncRNAهای بین‌ژنومی مانند HOTAIR و MALAT1 (به ترتیب در بازآرایی کروماتین و تنظیم مهاجرت سلولی

سرطان پستان نه تنها شایع‌ترین نوع سرطان در میان زنان سراسر جهان است، بلکه یکی از اصلی‌ترین علل مرگ و میر ناشی از سرطان محسوب می‌شود. بر اساس گزارش GLOBOCAN 2022، سالانه بیش از ۲۲۹۶۸۴۰ مورد جدید ابتلا و ۶۶۶۱۰۳ مرگ مرتبط با این بیماری ثبت می‌شود که به ترتیب ۱۱/۶ درصد و ۶/۹ درصد از کل موارد و مرگ‌های سرطانی زنان را تشکیل می‌دهد (۱). درحالی‌که کشورهای توسعه‌یافته به‌واسطه اجرای برنامه‌های غربالگری منظم، بهره‌گیری از فناوری‌های پیشرفته تشخیصی و درمان‌های هدفمند موفق به کاهش چشمگیر مرگ و میر شده‌اند، کشورهای کم‌درآمد و با درآمد متوسط همچنان شاهد افزایش سالانه ۱ تا ۵ درصدی بروز این بیماری هستند (۱). در ایران نیز سرطان پستان با روند افزایشی چشمگیر، به عنوان شایع‌ترین سرطان زنان و دومین علت مرگ ناشی از سرطان مطرح است. داده‌های نظام ثبت سرطان ایران و مطالعات بار جهانی بیماری‌ها (GBD) نشان می‌دهد که نرخ بروز استاندارد شده سنی این سرطان در سال‌های اخیر به حدود ۴۳ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ زن رسیده و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۵، افزایش ۶۳ درصد در تعداد موارد جدید نسبت به دهه گذشته رخ دهد (۲). مدل‌های پیش‌بینی جهانی نیز هشدار می‌دهند که در صورت فقدان مداخلات مؤثر، میزان ابتلا و مرگ و میر ناشی از سرطان پستان تا سال ۲۰۵۰ به ترتیب ۳۸ درصد و ۶۸ درصد افزایش خواهد یافت (۳). با لحاظ این نکته که میانگین سن تشخیص بیماران ایرانی حدود ده سال کمتر از متوسط جهانی است و بیش از ۸۰ درصد موارد در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شوند، اهمیت گسترش برنامه‌های غربالگری ملی و بهبود زیرساخت‌های تشخیص مولکولی مشخص‌تر می‌شود (۲). در مجموع ضرورت تقویت نظام ثبت سرطان مبتنی بر داده‌های

نقش دارند و با پیشرفت، متاستاز و مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی مانند تاکسول مرتبط هستند)، lncRNA پیش‌برنده BCAR4 (مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با تومور را فعال کرده و موجب افزایش مهاجرت و رشد سلولی می‌شود)، lncRNA داخل‌ژنومی ESR1 (که هم تنظیم‌کننده بیان گیرنده استروژن است و هم تغییر بیان آن با پاسخ به هورمون درمانی ارتباط دارد)، و NEAT1 (که در سازماندهی هسته سلول نقش دارد و با افزایش بیان خود، مقاومت به درمان و متاستاز را تقویت می‌کند)، همگی انواعی از lncRNAهای موثر در سرطان پستان هستند (۷). از کل انواع بسیار زیاد lncRNAهای شناسایی شده مرتبط با سرطان پستان که در تنظیم بیان ژن، پیشرفت تومور، متاستاز و مقاومت دارویی نقش دارند، بسیاری از این مولکول‌ها در مراحل اولیه تحقیقاتی قرار دارند، اما تعداد محدودی از آنها به عنوان نشانگرهای زیستی و اهداف درمانی در پزشکی شخصی‌سازی شده مورد توجه قرار گرفته‌اند. فناوری‌های نوین توالی‌یابی و ویرایش ژن، امکان بررسی دقیق و هدف‌گیری اختصاصی این مولکول‌ها را فراهم کرده و امید به بهبود نتایج درمان بیماران را افزایش داده است (۸). ناحیه کروموزومی 8q24 یکی از پیچیده‌ترین و کلیدی‌ترین لوکوس‌های ژنتیکی مرتبط با انکوژن در سرطان‌های انسانی است که میزبان انکوژن مهم MYC و lncRNAهای حیاتی از جمله PVT1 می‌باشد. این منطقه که در بازوی بلند کروموزوم ۸ و در بازه ژنومی تقریباً ۱۲۵ تا ۱۳۴ مگاباز قرار دارد، به دلیل تراکم بالای عناصر تنظیمی، تقویت‌کننده‌ها و ساختارهای سه‌بعدی پیچیده کروماتینی، نقش محوری در تنظیم بیان ژن‌ها ایفا می‌کند. تعاملات فضایی در این لوکوس، از طریق تشکیل حلقه‌های کروماتینی، تماس فیزیکی و هم‌تنظیمی پروموتورها، اگزونها و تقویت‌کننده‌های چندین ژن مجاور را ممکن

ساخته و شبکه‌های تنظیمی پویا و دقیقی در سطح رونویسی ایجاد می‌کند. تغییرات اپی‌ژنتیکی مانند متیلاسیون DNA و اصلاح هیستون در این ناحیه، موجب تثبیت بیان انکوژن MYC و lncRNAهای مرتبط می‌شود و این مولکول‌ها در قالب هاب‌های تنظیمی سه‌بعدی، حلقه‌های بازخورد مثبت را تقویت کرده و افزایش همزمان بیان و فعالیت مولکولی آنها را موجب می‌شوند. این فرایندها به طور مستقیم در تومورزایی، متاستاز و مقاومت دارویی نقش دارند. اخیراً فناوری‌های نوین نقشه‌برداری سه‌بعدی کروماتین (مانند Hi-C<sup>۳</sup>، ChIA-PET و Capture-C<sup>۴</sup>) امکان تحلیل دقیق این ساختارهای تنظیمی را فراهم کرده و افق‌های نوینی در فهم مکانیسم‌های مولکولی سرطان‌های مرتبط با ناحیه 8q24 گشوده‌اند (۹). درک جامع این شبکه‌های تنظیمی فضایی و مولکولی، کلید توسعه رویکردهای درمانی هدفمند و «پزشکی دقیق» در سرطان‌های مختلف، به ویژه سرطان پستان است و تمرکز تحقیقات بر این لوکوس می‌تواند منجر به کشف نشانگرهای زیستی حساس‌تر و درمان‌های دقیق‌تر گردد (۱۰-۱۴).

انکوژن MYC که در ناحیه 8q24 کروموزوم انسان رمزگذاری می‌شود (شکل ۱) یکی از فاکتورهای رونویسی هسته‌ای کلیدی و چندمنظوره است که نقش مرکزی در تنظیم بیان ژن‌های کنترل‌کننده فرایندهای حیاتی سلولی مانند رشد، تمایز، متابولیسم و آپوپتوز دارد و به‌طور گسترده در پاتوژنز انواع سرطان‌ها از جمله سرطان پستان نقش ایفا می‌کند. این انکوژن با فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی حیاتی مانند PI3K/AKT و Wnt/ $\beta$ -catenin و تنظیم ژن‌های مربوط به چرخه سلولی، تقسیم سلولی بی‌رویه و تغییر متابولیسم به سمت گلیکولیز را تسهیل می‌کند (۱۵). افزایش

<sup>3</sup> Chromosome Conformation Capture

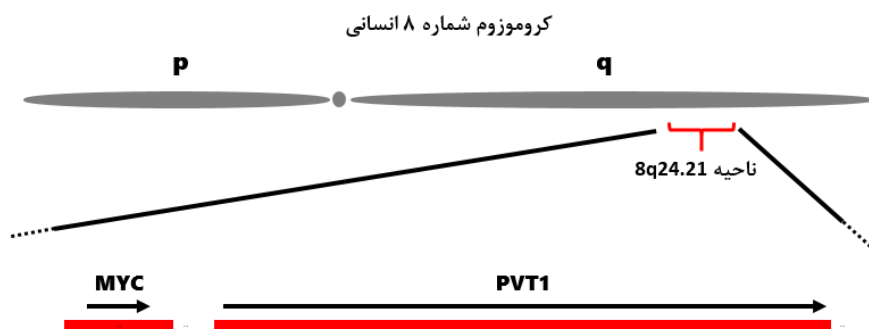
<sup>3</sup> High-throughput Chromosome Conformation Capture

<sup>3</sup> Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing

بیان و تثبیت فعالیت MYC در سرطان پستان با پیشرفت تومور، متاستاز و مقاومت به درمان‌های شیمی‌درمانی و هورمونی ارتباط نزدیکی دارد (۱۶).

PVT1 نیز که در ناحیه 8q24 کروموزوم انسان (در همسایگی ژنتیکی انکوژن MYC) رمزگذاری میشود (شکل ۱) نوعی lncRNA است که نقش برجسته‌ای در پاتوژنز انواع سرطان‌ها از جمله سرطان پستان ایفا می‌کند. ارتباط نزدیک ژن این دو مولکول باعث شکل‌گیری حلقه‌های بازخوردی تقویت‌کننده می‌شود که به تثبیت و افزایش فعالیت MYC منجر می‌گردد (۱۷). افزایش بیان PVT1 در سرطان‌های مختلف مانند پستان، با افزایش رشد تومور، مهاجرت سلولی، مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی و پیش‌آگهی ضعیف بیماران همراه است. به‌ویژه در سرطان پستان، PVT1 با جذب میکروRNAهای تنظیم‌کننده مسیرهای سیگنال‌دهی

حیاتی مانند PI3K/AKT و Wnt/ $\beta$ -catenin به تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی و آپوپتوز کمک کرده و تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی را افزایش می‌دهد. همچنین، PVT1 قادر است با تشکیل کمپلکس‌های پروتئینی، فرایندهای اپی‌ژنتیکی همچون متیلاسیون DNA و اصلاح هیستون را تحت تأثیر قرار دهد و بدین ترتیب بیان ژن‌های سرکوبگر تومور را کاهش دهد. از منظر بالینی، PVT1 به عنوان نشانگر زیستی تشخیصی و پیش‌آگهی در نمونه‌های بافت و مایعات بدن شناخته می‌شود و هدف‌گیری آن با فناوری‌های RNAi و ویرایش ژن، نویدبخش توسعه درمان‌های هدفمند و مؤثر در سرطان پستان و سایر بدخیمی‌هاست. با توجه به نقش چندوجهی PVT1 در پاتوژنز سرطان، مطالعه بیشتر این lncRNA می‌تواند به توسعه راهکارهای نوین «پزشکی دقیق» کمک شایانی نماید (۱۸).



شکل ۱. نمای شماتیک ناحیه 8q24 کروموزوم ۸ انسان که در آن موقعیت مجاور هم ژنهای MYC و PVT1 مشخص شده اند.

غیررمزگذار بلند PVT1 در نمونه‌های توموری سرطان پستان منتشر نشده است. گزارش حاضر برای نخستین بار به بررسی همزمان سطح بیان ژن MYC به عنوان یک انکوژن کلیدی در مسیرهای ایجاد و پیشرفت سرطان، و RNA غیررمزگذار بلند مجاور آن یعنی PVT1 در نمونه‌های بافت توموری سرطان پستان زنان ایرانی می‌پردازد. امید است نتایج این مطالعه، در کنار سایر گزارش‌های منتشرشده در زمینه بررسی همزمان بیان RNAهای غیررمزگذار مجاور انکوژن‌ها در بافت توموری سرطان پستان، بتواند به درک بهتر مکانیسم‌های

ضرورت انجام این تحقیق با توجه به چندعاملی بودن بیماری سرطان و نقش عوامل ترانسکریپتومیک هر جمعیت در بروز و پیشرفت این بیماری با نگاه نوین «پزشکی دقیق» از یک سو، و همچنین با در نظر گرفتن نقش کلیدی ژن‌های MYC و PVT1 در تنظیم فرایندهای سلولی و ارتباط آن‌ها با سرطان که پیش‌تر در مقدمه به آن اشاره شد، آشکار می‌شود. تا جایی که نگارندگان اطلاع دارند، تاکنون گزارشی از ایران درباره بررسی همزمان بیان ژن MYC و RNA

مولکولی این بیماری و توسعه راهکارهای درمانی هدفمند برای پژوهشگران و فناوریان آینده کمک نماید.

## مواد و روش کار

### متدولوژی و نوع مطالعه: مطالعه حاضر یک مطالعه

مشاهده‌ای تحلیلی با طراحی جفت شده در حوزه بیولوژی مولکولی است که به بررسی مقایسه‌ای بیان دو هدف مولکولی شامل انکوژن MYC و lncRNA مجاور آن در ناحیه 8q24 کروموزوم شماره ۸ انسانی، در نمونه‌های بافت توموری و غیرتوموری مجاور بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌پردازد. در طراحی روش این تحقیق، عوامل زیستی و ژنتیکی کنفاندینگ<sup>۳۷</sup> مانند سن، وضعیت فیزیولوژیک، تنوع ژنتیکی و متغیرهای محیطی که می‌توانند به طور مستقل بر سطح بیان ژن‌ها تأثیر گذاشته و واریانس داده‌ها را افزایش دهند، مورد توجه قرار گرفتند. به همین منظور، با استفاده از طراحی جفت‌شده که در آن نمونه‌های بافت توموری و غیرتوموری به طور همزمان از یک بیمار جمع‌آوری می‌شوند، این عوامل تا حد زیادی کنترل شده و تفاوت‌های بین‌فردی کاهش یافته است. این رویکرد باعث افزایش حساسیت و قدرت شناسایی تغییرات حتی جزئی در بیان ژن‌های هدف شده است. بنابراین، تحلیل داده‌ها به صورت مقایسه درون‌فردی<sup>۳۸</sup> انجام شد تا اعتبار نتایج حاصل ارتقا یابد.

### تعیین حجم نمونه: حجم نمونه این مطالعه بر اساس

مرور سیستماتیک مطالعات پیشین تعیین شد. بررسی پارامترهای آماری استخراج شده از مطالعات مرتبط نشان داد که «اندازه اثر» تغییرات بیان ژن‌ها معمولاً در محدوده متوسط تا بزرگ (اندازه اثر کوهن<sup>۳۹</sup> بین ۰/۵ تا ۰/۸) و انحراف معیار

بیان ژن‌ها بین (۰/۴ تا ۰/۷) متغیر است (۱۹-۲۲). جهت اطمینان از توان آماری کافی، کوچک‌ترین اندازه اثر مشاهده‌شده ( $d = 0.5$ ) به عنوان مبنا قرار گرفت. با فرض سطح معنی‌داری  $\alpha = 0.05$  و توان آماری ۸۰ درصد، حجم نمونه مورد نیاز تقریباً ۳۴ بیمار برآورد شد. در نهایت، با توجه به امکان حذف برخی نمونه‌های ناکافی و به منظور حفظ قدرت و اعتبار تحلیل، ۳۶ نمونه بالینی برای مطالعه انتخاب گردید.

### نمونه‌گیری بالینی و معیارهای ورود و خروج: ۳۶

نمونه بالینی شامل بافت توموری جامد و بافت غیرتوموری حاشیه‌ای همان تومورها با رعایت اصول اخلاقی و پس از تأیید پاتولوژیست از مازاد بافت بیماران مبتلا به سرطان پستان جمع‌آوری شد. بیماران تحت عمل جراحی اولیه بودند و پیش از جراحی هیچ گونه درمان سیستمیک (شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی) دریافت نکرده بودند. معیارهای ورود شامل زنان مبتلا به سرطان پستان با تشخیص قطعی و نمونه‌های دارای RNA با کیفیت مناسب بود. معیارهای خروج نیز شامل سابقه درمان سیستمیک پیش از نمونه‌برداری، نمونه‌های آلودگی شدید یا RNA با کیفیت پایین بودند. نمونه‌ها در کرایوتیوپ‌های عاری از RNase و به صورت منجمد در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد (نیتروژن مایع) با فلاسک نیتروژن مایع قابل حمل به آزمایشگاه، منتقل و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برخی ویژگی‌های دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران مبتلا به سرطان پستان تحت عمل جراحی مورد بررسی در این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است.

<sup>3</sup> within-subject comparison 8  
<sup>3</sup> Cohen's d 9

<sup>3</sup> Paired Observational Analytical Study 7  
<sup>3</sup> Confounding Factors

جدول ۱. برخی مشخصات دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران مبتلا به سرطان پستان تحت عمل جراحی.

ویژگی	مقدار
تعداد بیماران	۳۶ نفر (۱۰۰ درصد)
جنسیت	زن (۱۰۰ درصد)
سن (سال)	بازه: ۳۲-۷۲
	میانگین: ۴۸/۵
درجه تومور	I: ۴ نفر (۱۱/۱ درصد)
	II: ۱۹ نفر (۵۲/۸ درصد)
	III: ۱۳ نفر (۳۶/۱ درصد)

پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در

۳۷ درجه سانتی‌گراد، آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (RT) به واکنش اضافه گردید. سنتز cDNA در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۰ دقیقه ادامه یافت.

#### طراحی پرایمرها برای واکنش Real-Time PCR:

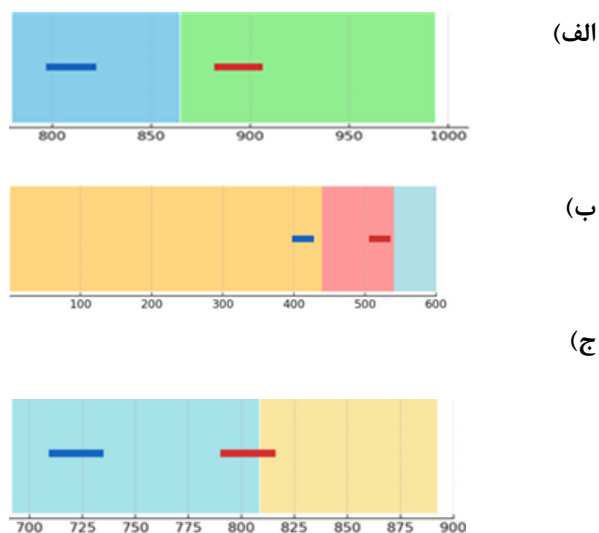
برای ارزیابی سطح بیان ژن‌های هدف، پرایمرهای اختصاصی بر اساس توالی cDNA هر ژن با استفاده از نرم‌افزارهای PerI Primer و Oligo 7 طراحی شدند. اندازه پرایمر (۱۸-۲۵ نوکلئوتید)، دمای ذوب و جلوگیری از تشکیل ساختارهای ثانویه و دایمر پرایمرها در طراحی مدنظر قرار گرفت. در خصوص ژن PVT1، طراحی پرایمرها بر روی دو اگزون آخر انجام شد تا رونوشت مرجع این ژن (NR\_003367.3) که بلندترین و کامل‌ترین رونوشت در میان حدود ۲۵ رونوشت گزارش شده است، در واکنش تکثیر پوشش داده شود. پرایمرهای پیشرو و پس‌رونده ژن‌ها به گونه‌ای طراحی شدند که روی اگزون‌های جداگانه قرار گیرند تا از تکثیر DNA ژنومی جلوگیری شود و محصولات PCR مشتق از cDNA از محصولات غیرهدف تفکیک شوند (شکل ۲). اختصاصیت پرایمرها با ابزار بیوانفورماتیکی Primer-BLAST (۲۳) در پایگاه NCBI بررسی و تأیید گردید. اطلاعات توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های هدف و مرجع در جدول ۲ ارائه شده است.

#### استخراج RNA کل:

استخراج RNA کل از نمونه‌های منجمد بافتی با استفاده از محلول TRIzol™ (Invitrogen) مطابق پروتکل سازنده انجام شد. نمونه‌ها به صورت مکانیکی تحت هود لامینار کلاس II هموژنیزه و سپس ۱ میلی‌لیتر محلول TRIzol™ به آن‌ها افزوده شد. پس از انکوباسیون با کلروفرم و سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، فاز آبی حاوی RNA جدا و با افزودن ایزوپروپانول رسوب داده شد. رسوب RNA با اتانول ۷۵ درصد شسته و در آب عاری از RNase حل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب، با استفاده از خوانش نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر نمونه‌ها در دستگاه PicoDrop و حفظ یکپارچگی RNA نمونه‌ها با الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی شدند. تمامی مراحل تحت شرایط استریل و ضد RNase انجام شد. برای حذف آلودگی‌های احتمالی DNA، RNA استخراجی با آنزیم DNAase I تیمار گردید.

#### سنتز cDNA: سنتز cDNA از RNA تیمار شده با

DNAase I با پرایمرهای رندوم هگزامر انجام شد. نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند تا ساختارهای ثانویه RNA از بین رود. سپس مخلوط واکنش شامل dNTPها، بافر اختصاصی و آب دیونیزه افزوده شد و



شکل ۲. نمای شماتیک جایگاه پرایمرهای Real-Time PCR روی اگزون‌های ژن‌های PVT1 (الف)، MYC (ب) و GAPDH (ج). مستطیل‌های رنگی نمایانگر اگزون‌ها و خطوط ضخیم درون آنها جایگاه پرایمرهای پیشرو (آبی) و پسرونده (قرمز) را نشان می‌دهند. محل هر پرایمر در شماره اگزون مندرج در جدول ۲ در اشکال فوق بوضوح مشخص شده است. همه آمپلیکون‌ها مرز اگزون-اگزون را پوشش می‌دهند و اختصاصیت واکنش نسبت به cDNA را تضمین می‌کنند.

جدول ۲- مشخصات ژنهای هدف و مرجع، و پرایمرهای مورد استفاده برای انجام واکنش‌های Real-Time PCR

نام ژن	نماد ژن	شماره دسترسی	توالی پرایمر و محل وقوع
پلاسموسیتوما واریانت ترنسلوکیشن ۱ (انکوژن PVT1)	PVT1	NR_003367.4	F: 5'-TGAGAACTGTCCTTACGTGACC-3' (اگزون ۹) R: 5'-AGAGACCAAGACTGGCTCT-3' (اگزون ۱۰)
پروتو-انکوژن MYC، فاکتور رونویسی bHLH	MYC	NM_002467.6	F: 5'-AGCGACTCTGAGGAGGAACAAG-3' (اگزون ۱) R: 5'-TGCGTAGTTGTGCTGATGTGTG-3' (اگزون ۲)
گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز	GAPDH	NM_002046.7	F: 5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3' (اگزون ۸) R: 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3' (اگزون ۹)

محاسبه شد تا مقایسه دقیق سطح بیان ژن‌ها در نمونه‌های توموری و غیرتوموری فراهم گردد.

#### ارزیابی نرمال بودن داده‌ها و تحلیل آماری: برای هر

ژن هدف، توزیع داده‌های بیان ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) در هر گروه با آزمون شاپیرو-ویلک<sup>۴</sup> ارزیابی شد. داده‌های با توزیع نرمال با آزمون t زوجی<sup>۴۱</sup> (پارامتریک) و داده‌های با توزیع غیرنرمال با آزمون رتبه‌ای علامت‌دار ویلکاکسون<sup>۴۲</sup> (غیرپارامتریک)

#### کمی‌سازی بیان ژن‌ها با تکنیک RT-qPCR: بیان

ژن‌های PVT1 و MYC با استفاده از تکنیک RT-qPCR و پرایمرهای اختصاصی در دستگاه ABI 7500 (Applied Biosystems) با کیت SYBR Green اندازه‌گیری شد. هر نمونه در سه تکرار فنی مستقل ارزیابی گردید. برای نرمال‌سازی بیان ژن‌های هدف این تحقیق از ژن مرجع GAPDH استفاده شد. بیان نسبی ژن‌ها با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

<sup>4</sup> Wilcoxon signed-rank test 2

<sup>4</sup> Shapiro-Wilk test 0

<sup>4</sup> Paired t-test 1

تحلیل گردیدند. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند و سطح معنی داری  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد. تحلیل‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام شد.

## نتایج

### ۱. نتایج کیفیت داده‌ها و کنترل‌های کیفی: توزیع

داده‌های بیان ژنی برای هر ژن در گروه‌های بافت توموری و غیرتوموری با آزمون شاپیرو-ویلک نشان داد که بیان ژن‌های PVT1 و MYC در هر دو گروه دارای توزیع نرمال است ( $p > 0.05$ ). تمامی نمونه‌ها دارای RNA با کیفیت و کمیت مطلوب بودند، بطوریکه نتایج نسبت جذب  $260/280$  نانومتر در اسپکتروفتومتری بین  $1/8$  تا  $2/0$  و الکتروفورز ژل آگارز نشان‌دهنده حفظ یکپارچگی RNA بود. واکنش‌های RT-qPCR با تکرارپذیری بالا و ضریب تغییرات کمتر از ۵ درصد انجام شدند که اعتبار و دقت داده‌ها را تضمین می‌کند. کنترل کیفیت اختصاصیت واکنش‌ها نیز با بررسی منحنی ذوب تأیید گردید و هیچ محصول غیر اختصاصی یا دایمر پرایمر مشاهده نشد.

### ۲. افزایش معنادار بیان PVT1 در نمونه‌های

توموری: نتایج نشان داد که بیان PVT1 در بافت‌های

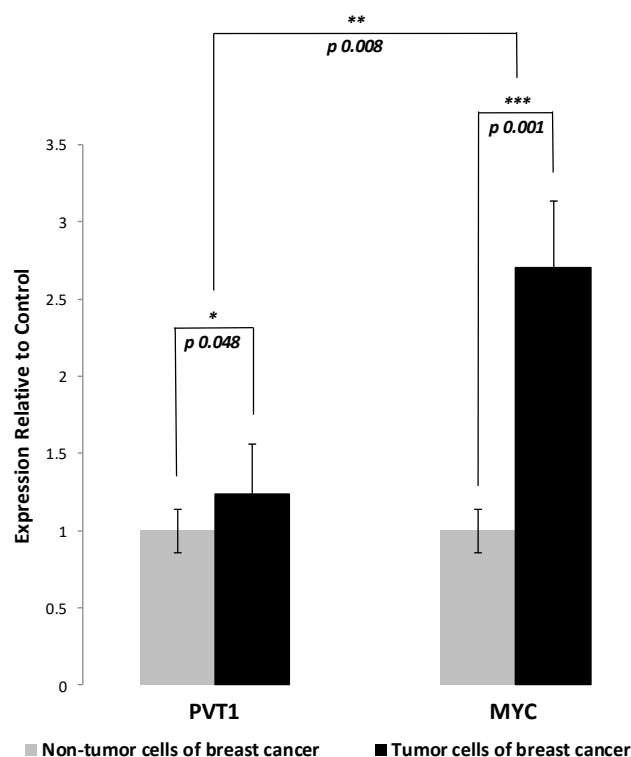
توموری نسبت به بافت‌های غیرتوموری مجاور، بطور معناداری افزایش یافته است. میانگین نسبت افزایش بیان (تغییر نسبی بیان) ژن PVT1 برابر با  $1/24$  بود و آزمون پارامتریک تی جفت‌شده این افزایش را از نظر آماری معنی‌دار نشان داد ( $p = 0.048$ ) (شکل ۳).

### ۳. افزایش چشمگیر بیان انکوژن MYC: نتایج

نشان داد بیان ژن MYC در نمونه‌های توموری بافت پستان نسبت به نمونه‌های غیرتوموری، بیان بسیار بالاتری دارد. میانگین نسبت افزایش بیان (تغییر نسبی بیان) ژن MYC برابر با  $2/70$  بود و تحلیل آماری نشان داد که این افزایش از نظر آماری بسیار معنادار است ( $p = 0.001$ ) (شکل ۳).

### ۴. تحلیل همبستگی بین بیان ژن‌ها: نتایج بررسی

ارتباط احتمالی بین بیان ژن‌های PVT1 و MYC با تحلیل همبستگی پیرسون و اسپیرمن بر اساس توزیع داده‌ها نشان داد بیان PVT1 و MYC دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار هستند ( $r = 0.459$ ;  $p = 0.008$ ). (شکل ۳) که این امر از احتمال وجود شبکه‌های تنظیمی مشترک و حلقه‌های بازخوردی بین این دو مولکول در ناحیه کروموزومی 8q24 حکایت دارد.



شکل ۳. تغییرات همزمان بیان ژنهای PVT1 و MYC در نمونه‌های بافت توموری پستان در مقایسه با بافت سالم حاشیه همان تومورها.

افزایش معنی‌دار PVT1 را در نمونه‌های توموری سرطان پستان گزارش کرده‌اند که با بدخیمی بیشتر، افزایش رشد و متاستاز همراه بوده است. گزارش‌های قبلی در مورد ارتباط افزایش بیان PVT1 با پیش‌آگهی ضعیف بیماران و پاسخ نامطلوب به درمان‌های هدفمند سرطان، می‌تواند بیانگر پتانسیل بالینی PVT1 در نقش بیومارکر تشخیصی و پیش‌بینی پاسخ به درمان باشد. از آنجایی که PVT1 قادر است با تنظیم مسیرهای سیگنالینگ حیاتی مانند PI3K/AKT و Wnt/ $\beta$ -catenin، فرایندهای تکثیر سلولی، بقای سلول و مقاومت دارویی را تسهیل کند لذا یافته‌های ما در این زمینه با مطالعات مولکولی اخیر نیز که تلاش می‌کنند PVT1 را به عنوان یک lncRNA کلیدی در پشتیبانی از انکوژن و پیشرفت سرطان پستان معرفی می‌کنند تطابق دارد (۱۸، ۲۰، ۲۴-۲۷).

## بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که در نمونه‌های بافت توموری زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان، بیان PVT1 و انکوژن MYC به‌طور معناداری افزایش یافته است. بررسی جامع مطالعات پیشین نیز بیانگر آن است که نقش PVT1 و انکوژن MYC در سرطان پستان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و یافته‌های قبلی، کاملاً با نتایج مطالعه حاضر همسو هستند. افزایش بیان PVT1 در این مطالعه، با توجه به گزارش‌های قبلی مبنی بر نقش این lncRNA در تثبیت و تقویت فعالیت انکوژن کلیدی مجاور خود (MYC) در انواع سرطان‌ها به‌ویژه سرطان پستان، هم‌راستا با یافته‌های سایر پژوهشگران در جمعیت‌های مختلف است. افزایش بیان PVT1 در بافت‌های توموری سرطان پستان یکی از یافته‌های پایدار و مکرر در گزارش‌های قبلی است. مطالعات قبلی،



در مورد انکوژن MYC، نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش بیان آن در بافت توموری نیز با گزارش‌های فراوانی همسوست. افزایش بیان قابل توجه MYC در یافته‌های این تحقیق، تاییدی دیگر بر نقش این انکوژن کلیدی به عنوان محرک اصلی در مسیرهای مولکولی تومورزایی است. این ویژگی‌ها، MYC را به هدفی کلیدی در «پزشکی دقیق» برای توسعه درمان‌های شخصی‌سازی شده سرطان پستان تبدیل کرده است. به عنوان مثال، وجود مقالاتی در مورد امکان حضور MYC پلاسمایی و آنتی بادی ضد آن در گردش خون بیماران سرطانی، امید به بهبود نتایج درمانی بیماران را افزایش می‌دهد. گزارش‌های قبلی در مورد نقش حیاتی MYC در تنظیم مسیرهای سلولی نشان داده اند که این افزایش فعالیت موجب مقاومت به درمان‌های هورمونی و شیمی‌درمانی می‌شود. همچنین افزایش بیان MYC که در زیرگروه‌های مختلف سرطان پستان گزارش شده و ارتباط آن با پیشرفت بیماری و کاهش بقاء بیماران قبل از نشان داده شده است. این یافته‌های سلولی و مولکولی که بیان MYC را به عنوان یکی از عوامل اصلی تومورزایی و مقاومت درمانی در سرطان پستان برجسته می‌کنند همسو با یافته‌های این تحقیق هستند (۱۵، ۱۶، ۲۸-۳۱).

از دیدگاه تلفیقی، نتایج این تحقیق در مورد ارتباط مثبت افزایش بیان همزمان PVT1 و MYC، با فرضیات جاری سلولی و مولکولی در این خصوص همخوانی داشته و موید نقش PVT1 به عنوان تنظیم‌کننده کلیدی در پاتوژنز سرطان پستان می‌باشد (۳۲). افزایش همزمان PVT1 و MYC می‌تواند بازتابی از هم‌افزایی این مولکول‌ها در ایجاد و پیشرفت فرایندهای انکوژنز باشد. این الگوهای بیان می‌توانند به عنوان بیومارکرهای مولکولی بالقوه برای تشخیص یا پیش‌بینی پاسخ درمانی در سرطان پستان، هدف بررسی توسط محققین آتی قرار گیرند. همانطور که در بخش مقدمه این مقاله به نقش تثبیت‌کننده PVT1 در فعالیت انکوژن MYC از طریق

فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ اشاره شد، افزایش بیان این دو مولکول موجب افزایش تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی می‌شود. تغییر بیان همزمان این دو ژن که در نتایج این بررسی مشاهده شد، می‌تواند تایید کننده فرضیات جدید تعاملات پیچیده MYC با PVT1 و وجود شبکه‌های بازخوردی تنظیمی مهمی باشد که در تثبیت و تنظیم فعالیت این انکوژن نقش دارند (۲۵). به‌ویژه اگر به این نکته توجه شود که از نگاه هدف درمانی سرطان، هدف‌گیری مستقیم MYC به دلیل پیچیدگی‌های ساختاری و عملکردی آن دشوار است؛ درحالی‌که استفاده از مهارکننده‌های مولکولی کوچک، RNAi و فناوری‌های نوین ویرایش ژن، علیه PVT1 می‌تواند نویدبخش توسعه روش‌های درمانی نوین و مؤثر باشد (۲۸، ۲۹، ۳۱). تعاملات پیچیده بین PVT1 و MYC که در مطالعات متعددی اثبات شده‌اند، نقش این دو ژن را در ایجاد شبکه‌های تنظیمی مولکولی تقویت می‌کنند. اخیراً گزارش‌های جدید، PVT1 را به عنوان یک هاب تنظیم‌کننده سب‌بعدی کروماتینی در ناحیه 8q24 و با نقش کمک‌کننده در تثبیت و افزایش فعالیت MYC مطرح می‌کنند. این گزارش‌ها نشان‌دهنده اهمیت هدف‌گیری همزمان این دو مولکول در رویکردهای درمانی آینده است. این موضوع تطابق نزدیکی با یافته‌های ما دارد (۱۰، ۱۱، ۱۴). همچنین، نتایج ترکیبی این مطالعه با سایر مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تحلیل همزمان بیان PVT1 و MYC می‌تواند دید جامعی از شبکه‌های تنظیمی و مسیرهای مولکولی در سرطان پستان ارائه دهد. این رویکرد چندبعدی برای شناسایی نشانگرهای زیستی مولکولی با قابلیت پیش‌بینی و درمان هدفمند در «پزشکی دقیق» بسیار ارزشمند است (۳۳).

یافته‌های مطالعه حاضر، ضرورت انجام پژوهش‌های تکمیلی دقیق و چندجانبه در حوزه بیان و تنظیم مولکولی lncRNAهای اطراف انکوژن MYC علاوه بر PVT1 را برجسته می‌سازد. مطالعات بعدی می‌تواند با افزایش حجم

توسعه نشانگرهای زیستی و درمان‌های هدفمند مبتنی بر RNAهای غیررمزگذار مفید باشد.

### تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل و پرسنل آزمایشگاه‌های مرتبط بابت همکاری در تصویب و اجرای این پروژه که در قالب پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی نویسنده اول، تحت راهنمایی نویسنده مسوول و مشاوره نویسنده دوم انجام شد قدردانی می‌گردد.

نمونه بیشتر و گسترش مطالعات به جمعیت‌های متنوع‌تر با مشخصات بالینی و مولکولی متفاوت صورت پذیرد تا اثر متقابل متغیرهای جمعیتی و مرحله بیماری بر الگوهای بیان کلیه ژن‌های واقع در هاب ناحیه 8q24 دقیق‌تر تبیین شود. به منظور درک مکانیزم‌های تنظیمی پیچیده، مطالعات عملکردی با بهره‌گیری از فناوری‌های پیشرفته نظیر کروماتین ایمونوپریفینگ (ChIP-Seq)، تکنولوژی‌های ویرایش ژنوم مانند CRISPR-Cas9، و تحلیل‌های RNA-Seq برای شناسایی تعاملات RNA-پروتئین و مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط، امری حیاتی است. توسعه پانل‌های بیومارکری ترکیبی شامل PVT1 و MYC ممکن است در آینده به دقت تشخیص مولکولی و پیش‌آگهی سرطان پستان کمک نماید و امکان پایش پاسخ درمانی را بهبود بخشد. همچنین، بررسی نقش این مولکول‌ها در مقاومت دارویی از طریق مدل‌های *in vitro* و *in vivo* می‌تواند به تحقیقات همسو با کشف اهداف درمانی نوین برای مهار مسیرهای مرتبط کمک نماید. در نهایت، به‌کارگیری استراتژی‌های درمانی نوین مبتنی بر RNAi، آنتی‌سنس اولیگونوکلوئوتیدها و سیستم‌های ویرایش ژن هدفمند، با هدف تعدیل بیان lncRNAها، پتانسیل تحول در درمان شخصی‌سازی شده سرطان پستان را داراست. این رویکردها زمینه‌ساز ترجمه مؤثر یافته‌های مولکولی به درمان‌های بالینی پیشرفته و افزایش بقای بیماران خواهند بود.

### نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش برای نخستین بار افزایش بیان ژن‌های PVT1 و MYC را در بافت توموری سرطان پستان زنان ایرانی نشان می‌دهد و شواهد جدیدی درباره نقش آن‌ها در پاتوژنز و احتمالاً مقاومت دارویی این بیماری فراهم می‌کند. این نتایج می‌تواند در مسیر تحقیقات آینده برای

## مراجع

1q32. 1, 5p15. 33 and 8q24. 21. Oncotarget. 2016; 7(41):66328.

10. Grisanzio C, Freedman ML. Chromosome 8q24-associated cancers and MYC. *Genes & Cancer*. 2010; 1(6):555–9.

11. Li R, Qin Z, Tang J, Han P, Xing Q, Wang F, et al. Association between 8q24 gene polymorphisms and the risk of prostate Cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Cancer*. 2017; 8(16): 3198.

12. Shi J, Zhang Y, Zheng W, Michailidou K, Ghoussaini M, Bolla MK, et al. Fine-scale mapping of 8q24 locus identifies multiple independent risk variants for breast cancer. *International journal of cancer*. 2016; 139(6):1303–17.

13. Teerlink CC, Leongamornlert D, Dadaev T, Thomas A, Farnham J, Stephenson RA, et al. Genome-wide association of familial prostate cancer cases identifies evidence for a rare segregating haplotype at 8q24. 21. *Human Genetics*. 2016; 135:923–38.

14. Wilson C, Kanhere A. 8q24. 21 locus: a paradigm to link non-coding RNAs, genome polymorphisms and cancer. *International journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(3):1094.

15. Gao F-y, Li X-t, Xu K, Wang R-t, Guan X-x. c-MYC mediates the crosstalk between breast cancer cells and tumor microenvironment. *Cell Communication and Signaling*. 2023; 21(1):28.

16. Qu J, Zhao X, Wang J, Liu X, Yan Y, Liu L, et al. MYC overexpression with its prognostic and clinicopathological significance in breast cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(55):93998.

17. Jin K, Wang S, Zhang Y, Xia M, Mo Y, Li X, et al. Long non-coding RNA PVT1 interacts with MYC and its downstream molecules to synergistically promote tumorigenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019; 76(21):4275–89.

18. Baljon KJ, Ramaiah P, Saleh EAM, Al-Dolaimy F, Al-Dami FH, Gandla K, et al.

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2024;74(3):229–63.

2. Saedi S, Saedi A, Ghaemi MM, Milani FM. Epidemiological study of breast cancer in Iran: a micro review study. *Eurasian Journal of Science and Technology*. 2022; 2(3):227–35.

3. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. 2021;127(16):3029–30.

4. Statello L, Guo C-J, Chen L-L, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2021; 22 (2): 96-118.

5. Mitra AG. Non-Coding RNA in Cancer: Pathogenesis to therapeutic targets. *Current Opinion in Physiology*. 2025:100847.

6. El-Ashmawy NE, Khedr EG, Abo-Saif MA, Hamouda SM. Long noncoding RNAs as regulators of epithelial mesenchymal transition in breast cancer: A recent review. *Life Sciences*. 2024; 336:122339.

7. Shaikh M, Doshi G. Unraveling non-coding RNAs in breast cancer: mechanistic insights and therapeutic potential. *Medical Oncology*. 2024; 42(1): 37-45.

8. Ahmadi S, Yazdi F, Khastar S, Kaur I ,Ahmed MH, Kumar A, et al. Molecular Mechanism of lncRNAs in Regulation of Breast Cancer Metastasis; a Comprehensive Review. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2024:1–17.

9. Zhang M, Wang Z, Obazee O, Jia J, Childs EJ, Hoskins J, et al. Three new pancreatic cancer susceptibility signals identified on chromosomes

- MYC duet-related genes for predicting survival and characterization of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Frontiers in Immunology*. 2024; 15:1435593.
28. Stipp MC, Acco A. c-Myc-targeted therapy in breast cancer: A review of fundamentals and pharmacological Insights. *Gene*. 2025:149209.
29. Shi W, Xu X, Huang R, Yu Q, Zhang P, Xie S, et al. Plasma C-MYC level manifesting as an indicator in progression of breast cancer. *Biomarkers in Medicine*. 2019; 13(11):917–29.
30. Kevin K. A systematic review on MYC inhibition in the treatment of Breast cancer: BRAC University; 2025.
31. Whitfield JR, Soucek L. MYC in cancer: from undruggable target to clinical trials. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2025:1–13.
32. Maqsood Q, Khan MU, Fatima T, Khalid S, Malik ZI. Recent Insights Into Breast Cancer: Molecular Pathways, Epigenetic Regulation, and Emerging Targeted Therapies. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. 2025;19:11782234251355663.
33. Wang Y, Bu N, Luan X-f, Song Q-q, Ma B-F, Hao W, et al. Harnessing the potential of long non-coding RNAs in breast cancer: From etiology to treatment resistance and clinical applications. *Frontiers in Oncology*. 2024;14:1337579.
- LncRNA PVT1: as a therapeutic target for breast cancer. *Pathology-Research and Practice*. 2023; 248:154675.
19. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *nature*. 2010; 464(7291):1071–6.
20. Liu S, Chen W, Hu H, Zhang T, Wu T, Li X, et al. Long noncoding RNA PVT1 promotes breast cancer proliferation and metastasis by binding miR-128-3p and UPF1. *Breast Cancer Research*. 2021;23(1):115.
21. Zhang D, Sun G, Zhang H, Wang X, Li Y. Long non-coding RNA PVT1 facilitates cervical cancer progression through negative modulation of miR-128-3p. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(4):4522–9.
22. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell*. 2012; 149(1):22–35.
23. Samal KC, Sahoo JP, Behera L, Dash T. Understanding the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program and a step-by-step guide for its use in life science research. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika*. 2021; 36(1):55–61.
24. Lu D, Luo P, Wang Q, Ye Y, Wang B. lncRNA PVT1 in cancer: a review and meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*. 2017 ;474:1–7.
25. Mirmazhari SP, Abdi MJ, Mosadeghrad AH, Bonab RA, Babadi AA, Rigi G, et al. Unraveling the Complex Interplay between lncRNAs and Myc in Breast Cancer. 2023.
26. Li R, Wang X, Zhu C, Wang K. lncRNA PVT1: a novel oncogene in multiple cancers. *Cellular & molecular biology letters*. 2022; 27(1):84.
27. Ren B, Ren J, Gu M, Liu X, You L, Zhao Y. Construction of a novel model based on PVT1-

## Co-upregulation of PVT1 and MYC in Breast Tumor Tissues of Iranian Patients: Enhanced Evidence for lncRNA and Neighboring Oncogene Crosstalk

Yousof Reza Rezaei-Malek <sup>1</sup>, Mohammad Shafiee <sup>2</sup>, Reza Tabaripour <sup>3\*</sup>

1. Master's Degree in Cellar and Molecular Biology, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran
2. Department of Genetics, School of Advanced Medical Sciences, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran

\*Corresponding author: [tabaripoor@gmail.com](mailto:tabaripoor@gmail.com)

### Abstract

Breast cancer is the most common malignant neoplasm among women worldwide, and its rising incidence, particularly at younger ages, poses a major public health challenge. Despite significant advances, many cellular, molecular, and genetic mechanisms underlying breast tumorigenesis and progression remain unclear. In recent years, long non-coding RNAs (lncRNAs) have emerged as key regulators of gene expression and cellular processes, especially in cancer. The 8q24 region of human chromosome 8 contains two adjacent genes: MYC, a well-established oncogene, and PVT1, a lncRNA with diverse regulatory functions. While the oncogenic role of MYC in breast cancer pathogenesis is well characterized, the functional relationship between MYC and PVT1 and their combined effects on tumorigenic pathways remain to be fully elucidated. This study aimed to investigate the co-expression of MYC and PVT1 in paired tumor and adjacent non-tumor breast tissues from Iranian women. Expression levels of MYC and PVT1 were assessed in 36 paired samples using RT-qPCR following RNA isolation and cDNA synthesis. The results demonstrated that MYC and PVT1 expression was significantly increased by 2.70-fold ( $p$  0.001) and 1.24-fold ( $p$  0.048), respectively, in tumor tissues compared to adjacent normal tissues. Moreover, a significant positive correlation was observed between the expression levels of PVT1 and MYC ( $r=0.459$ ;  $p<0.01$ ). The findings of this study, for the first time, demonstrate the upregulation of PVT1 and MYC genes in breast tumor tissues of Iranian women. These results further highlight the roles of PVT1 and MYC in the pathogenesis and possibly drug resistance of this disease, and may be beneficial for future research aimed at developing novel biomarkers and targeted therapies based on long non-coding RNAs.

**Keywords:** breast cancer, lncRNA, MYC, PVT1

**Contents**

**Isolation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strains Containing the *arcA* Gene Producing Enterotoxins A, B, C, D, E, G, and I from Hospital Infections in Isfahan, Iran**

Behshood P .....17

**lncRNAs in multiple sclerosis**

Nasiri N, Zamanzadeh Z, Mahdipour A, Mahdipour A .....27

**Cloning and phylogenetic analysis of Bovine immunodeficiency virus gag gene in Iranian isolates**

Tajbakhsh E .....39

**ANTIBIOTIC HARITAKI CHURNA CHOCOLATES- A SWEETER WAY TO TREAT PAEDIATRIC**

Sukanya Jitendra Patil , Rushikesh Shivaji Hingmire, Sneha Shrikant Kavitate, Pranali Manohar Pinage, Priyanka Dinkar Hankare .....61

**Review of the Properties of Different Chitosan Preparation Methods**

Shahriar S .....71

**Co-upregulation of PVT1 and MYC in Breast Tumor Tissues of Iranian Patients: Enhanced Evidence for lncRNA and Neighboring Oncogene Crosstalk**

Yousof Reza Rezaei-Malek , Mohammad Shafiee , Reza Tabaripour .....85



