

تأثیر عصاره الکلی گیاه متکا بر بیان ژن‌های $Agtr^2$ ، $Agtr^1$ و ATP^1A^1 در سلول‌های کلیه

The effect of *Ferula Persica* alcoholic extract on $AGTR^2$, AGT and ATP^1A^1 gene expression in kidney cells

نرگس دعاگو^{*۱}

^۱* - نویسنده، فارغ التحصیل کارشناسی زیست سلولی مولکولی، کارشناسی ارشد ژنتیک، پست الکترونیک: Narges.agoo@yahoo.com

چکیده

گیاه *Ferula persica* (متکا) از تیره چتریان، گیاهی بومی با خواص دارویی متعدد از جمله اثرات ضدالتهابی، ضدتب و کاهنده فشارخون است. این پژوهش به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره فنلی و اسانس‌های روغنی سرشاخه گلدار متکا و تأثیر آن بر بیان سه ژن کلیدی کنترل فشارخون ($AGTR^2$ ، AGT و ATP^1A^1) در سلول‌های کلیه (رده ACHN IBRC C^{۱۰۱۰۵}) پرداخت. ابتدا اسانس‌ها با روش تقطیر بخار آب و عصاره فنلی با متانول ۸۰٪ استخراج شدند. ارزیابی ترکیبات فنلی با روش فولین-سیتوکالتو و سنجش DPPH نشان داد که گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی است. آزمون MTT در بازه‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تأثیر بیشتر اسانس‌ها را در کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی نسبت به عصاره فنلی نشان داد. همچنین، آزمون TAC تأیید کرد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها برتر است. بررسی بیان ژن‌ها با Real-Time PCR آشکار کرد که هر دو عصاره بر افزایش بیان ژن‌های $AGTR^2$ ، AGT و ATP^1A^1 مؤثرند، اما اثر اسانس‌ها چشمگیرتر بود. این نتایج نشان می‌دهد متکا از طریق تنظیم این ژن‌ها می‌تواند به عنوان گزینه‌ای طبیعی برای کنترل فشارخون مطرح شود. با توجه به پراکنش گسترده گیاه در ایران و عوارض کمتر نسبت به داروهای شیمیایی، توسعه داروهای گیاهی بر پایه متکا می‌تواند در مدیریت فشارخون و کاهش وابستگی به داروهای سنتتیک مؤثر باشد.

کلیدواژه‌ها: فرولا پرسیکا، متکا، تیره چتریان، فشارخون، اسانس روغنی، فنل، ژن AGT ، ژن $AGTR^2$ ، ژن ATP^1A^1 .

Abstract:

Ferula persica (Motka), a native plant of the Apiaceae family, possesses various medicinal properties, including anti-inflammatory, antipyretic, and blood pressure-lowering effects. This study investigates the antioxidant properties of phenolic extract and essential oils from the flowering branches of Motka, and their impact on the expression of three key genes involved in blood pressure regulation— AGT , $AGTR^2$, and ATP^1A^1 in kidney cells (ACHN cell line, IBRC C^{۱۰۱۰۵}). Initially, the essential oils were extracted via steam distillation, and the phenolic extract was obtained using ۸۰٪ methanol. The

phenolic compounds were assessed by the Folin-Ciocalteu method, and antioxidant activity was measured using DPPH, indicating significant antioxidant capacity. The MTT assay over ۲۴, ۴۸, and ۷۲ hours demonstrated that the essential oils had a greater effect in reducing the viability of cancer cells compared to the phenolic extract. Additionally, the TAC assay confirmed the superior antioxidant activity of the oils. Real-Time PCR analysis revealed that both extracts increased the expression of the target genes, with the oils showing a more pronounced effect. These findings suggest that Motka, by regulating these genes, could serve as a natural option for blood pressure control. Considering its widespread distribution in Iran and fewer side effects compared to chemical drugs, developing herbal medicines based on Motka could be effective in managing hypertension and reducing reliance on synthetic drugs.

Keywords: *Ferula Persica*, Motka, Apiaceae Family, blood pressure, essential oil, phenol, AGT gene, AGTR^۲ gene, ATP^۱A^۱ gene.

۱. مقدمه

جنس فرولا از خانواده چتریان، با بیش از ۱۵۰ گونه، بومی آسیای مرکزی است که ۵۳ گونه از آن به صورت خودرو در ایران می‌روید. این گیاهان هم به عنوان غذا و هم در طب سنتی کاربرد دارند. از گونه‌های بومی ایران می‌توان به آنغوزه، باریجه و متکا اشاره کرد. آنغوزه و باریجه عمدتاً در ارتفاعات و کوهستان‌های شمالی ایران، به ویژه مناطق اطراف دماوند، یافت می‌شوند (جدیدی و همکاران، ۱۳۸۹). در این پژوهش، از عصاره الکلی گونه متکا استفاده شده است که به صورت گسترده در شهرستان سمنان رویش دارد و دارای مصارف غذایی و دارویی متعددی است. استفاده از گیاهان دارویی به عنوان محصولات فرعی مرتعی در ایران سابقه‌ای دیرینه دارد. امروزه، فشار خون بالا به عنوان یکی از عوامل تهدیدکننده سلامت، به ویژه در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران، شناخته می‌شود. این بیماری از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن محسوب می‌گردد و کنترل آن نیازمند راهکارهای درمانی مؤثر است.

هدف از این مطالعه، بررسی ویژگی‌های اکولوژیک و ترکیبات شیمیایی گیاه متکا و تأثیر عصاره الکلی آن بر بیان سه ژن *Agtr^۲*، *Agtr^۱* و *ATP^۱A^۱* در سلول‌های کلیه به منظور کاهش فشار خون است. در این راستا، ابتدا پراکنش جغرافیایی گیاه متکا به طور کامل بررسی شد و نمونه‌های مورد نیاز از مناطق رویشی این گیاه در سمنان جمع‌آوری گردید. پس از خشک کردن گیاه، استخراج اسانس و عصاره انجام شد و سپس سنجش‌های فنل، آنتوسیانین، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر روی آن صورت گرفت. این پژوهش با ترکیب روش‌های اکولوژیک، فیتوشیمیایی و مولکولی، در پی ارائه بینشی جدید درباره مکانیسم‌های احتمالی تأثیر عصاره متکا بر تنظیم فشار خون از طریق مسیرهای مرتبط با ژن‌های کلیدی است.

جنس فرولا پرسیکا از تیره چتریان که گیاهی بومی آسیای مرکزی است، به صورت گسترده در مناطق مختلف ایران می‌روید. این گیاه که با نام عربی سکبینه شناخته می‌شود، گیاهی علفی و چندساله بوده و ارتفاع آن به ۱ تا ۲ متر می‌رسد. برگ‌های بزرگ این گیاه به صورت ظریف و جدا شونده هستند و گلبرگ‌های آن به رنگ زرد، سبز متمایل به سفید یا زرد دیده می‌شوند که به شکل دراز و بیضی با رأس خمیده می‌باشند. این گیاه در مناطق مختلفی از ایران از جمله ارتفاعات دماوند و فیروزکوه در استان تهران، ارتفاعات مهدشهر و شاهرود در استان سمنان، شهرستان کوهسرخ در استان خراسان رضوی و همچنین در مناطق کرمان، سقز، همدان، لرستان و آذربایجان غربی یافت می‌شود.

گیاه متکا هم به عنوان دارو و هم به عنوان غذا مورد استفاده قرار می گیرد. در طب سنتی از اندام های مختلف این گیاه به ویژه گل و برگ های آن استفاده های گسترده ای می شود. مطالعات مختلف انجام شده بر روی گونه فرولا پرسیکا (متکا) نشان داده است که این گیاه دارای خواص دارویی متعددی از جمله اثرات ضد درد، ضد التهاب، ضد تب و ضد تشنج می باشد. فشار خون بالا به عنوان یکی از مهم ترین عوامل تهدید کننده سلامت انسان شناخته می شود که یک بیماری چندعاملی بوده و تحت تأثیر ترکیبی از عوامل محیطی و ژنتیکی ایجاد می گردد. در این میان، سه ژن $Agtr^2$ ، $Agtr^1$ و ATP^1A^1 که در سلول های کلیه بیان می شوند، نقش کلیدی در سیستم کنترل فشار خون ایفا می کنند.

اهمیت و ضرورت این تحقیق از چند جنبه قابل بررسی است. نخست آنکه با توجه به افزایش روزافزون بیماری های مزمن مانند فشار خون و عوارض ناشی از آن، یافتن راهکارهای درمانی جدید با منشأ گیاهی و با حداقل عوارض جانبی از اولویتهای تحقیقات پزشکی محسوب می شود. گیاه فرولا پرسیکا (متکا) با سابقه طولانی مصرف در طب سنتی و دارا بودن ترکیبات فعال زیستی، گزینه مناسبی برای توسعه داروهای گیاهی مؤثر بر فشار خون به شمار می آید. در این پژوهش، با استفاده از روش های استاندارد استخراج از جمله تقطیر با بخار آب برای اسانس گیری و استخراج فلاونوئیدها با متانول، ترکیبات مؤثره گیاه به صورت علمی جداسازی و ارزیابی می شود. سپس با انجام آزمون های مختلف از جمله سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH و ارزیابی سمیت سلولی با تست MTT، ایمنی و اثربخشی عصاره مورد بررسی قرار می گیرد. در نهایت، تأثیر عصاره الکلی این گیاه بر بیان ژن های کلیدی دخیل در تنظیم فشار خون ($Agtr^2$ ، $Agtr^1$ و ATP^1A^1) در سلول های کلیه ارزیابی می شود که می تواند گامی مهم در شناخت مکانیسم های مولکولی اثرات ضد فشارخونی این گیاه محسوب شود. این تحقیق از آن جهت حائز اهمیت است که هم به توسعه دانش پایه در مورد خواص درمانی گیاهان بومی کمک می کند و هم می تواند مبنایی برای تولید داروهای گیاهی جدید در کنترل فشار خون بالا باشد. از این رو، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر عصاره الکلی گیاه متکا بر بیان این سه ژن کلیدی که در تنظیم فشار خون نقش دارند، انجام شده است.

لذا، اهداف مشخص تحقیق به شرح زیر می باشد:

۱. شناسایی ترکیبات فنلی و اسانس های روغنی و بررسی خواص آنتی اکسیدانی در گونه گیاهی متکا
 ۲. ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی و اسانس های روغنی استخراج شده از این گیاه
 ۳. بررسی خاصیت سمیت سلولی ترکیبات فنلی و اسانس های روغنی
 ۴. مطالعه تأثیر ترکیبات فنلی و اسانس های روغنی *Ferula persica* بر بیان ژن های $Agtr^2$ ، $Agtr^1$ و ATP^1A^1
- این اهداف به صورت نظام مند و گام به گام طراحی شده اند تا ابتدا ترکیبات مؤثره گیاه شناسایی شده، سپس خواص آنتی اکسیدانی و سمیت آن ها ارزیابی گردد و در نهایت تأثیر آن ها بر بیان ژن های کلیدی مرتبط با فشار خون مورد بررسی قرار گیرد.

۲. پیشینه تحقیق

تا کنون، مطالعات زیادی در این حوزه انجام شده است که در این بخش، تعدادی از مهمترین آن‌ها معرفی و مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد.

رضایی و همکاران (۱۳۸۱) اولین مطالعه جامع درباره ویژگی‌های گیاه‌شناختی، پراکنش جغرافیایی، عوامل اکولوژیک مؤثر، روش‌های کشت و ترکیبات شیمیایی گونه باریجه (*Ferula persica*) در ایران را انجام دادند. این تحقیق به‌طور ویژه ترکیبات شیمیایی بخش‌های مختلف گیاه شامل بذر، شیرابه و غده را در نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف کشور بررسی کرد. همچنین، ادنایی و همکاران (۱۳۸۴) ویژگی‌های رویشی و ترکیبات شیمیایی گونه *Ferula gummosa* Boiss در استان قم را مطالعه کردند. این پژوهش به‌عنوان پایه‌ای برای مقایسه ترکیبات شیمیایی گونه‌های مختلف فرولا عمل می‌کند. علاوه‌براین، مرتضایی‌نژاد و صادقیان (۱۳۸۶) ترکیبات مؤثره گیاه دارویی باریجه را در سه منطقه شهرستان کاشان مقایسه کردند و نشان دادند که شرایط اکولوژیک بر کیفیت ترکیبات مؤثره گیاه تأثیرگذار است.

جدیدی و همکاران (۱۳۸۹) اثرات عصاره گیاه سکبینه (*Ferula persica* L.) را بر علائم ناشی از قطع مورفین و دوره خواب در موش‌های سوری بررسی کردند. این مطالعه نشان داد که این گیاه دارای ترکیبات مؤثر بر سیستم عصبی مرکزی است. همچنین، مظفری و همکاران (۱۳۹۱) عصاره هگزان اندام هوایی گیاه فرولا پرسیکا (متکا) را مطالعه کردند و ترکیبات لیپیدی آن را شناسایی نمودند. علاوه‌براین، امرایی و گیمدیل (۱۳۹۲) ترکیبات شیمیایی اسانس باریجه را در رویشگاه طبیعی شهرستان الیگودرز بررسی کردند و نشان دادند که اسانس این گیاه حاوی ترکیبات فنلی و ترپنئیدی است.

زینلی و همکاران (۱۳۹۲) اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره اندام‌های مختلف گیاه باریجه (*Ferula gummosa* Boiss) را در دو رویشگاه مختلف استان خراسان رضوی مقایسه کردند و دریافتند که عصاره ریشه دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. همچنین، اصغری و همکاران (۱۳۹۳) خواص ضدباکتریایی و فیتوشیمیایی اسانس گیاه باریجه را در منطقه میقان استان سمنان بررسی کردند و نشان دادند که این اسانس دارای اثرات ضدباکتریایی قوی است. علاوه‌براین، کریمی‌ثانی و همکاران (۱۳۹۵) خواص فلاونوئیدی، ترکیبات شیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه باریجه را در شهرستان سبزوار با استفاده از GC/MS بررسی کردند.

سروی و همکاران (۱۳۹۶) محتوای تام فلاونوئیدی عصاره گیاه *Ferula persica* جمع‌آوری‌شده از ارتفاعات البرز مرکزی را اندازه‌گیری کردند و نشان دادند که این گیاه منبع غنی از فلاونوئیدهاست. همچنین، ایزدی‌نیا (۱۳۹۸) تجزیه شیمیایی روغن اسانس برگ و گل متکا را انجام داد و ترکیبات اصلی آن را شناسایی کرد. علاوه‌براین، مجیدی و همکاران (۱۳۹۹) اثر روش‌های مختلف استخراج و نقش قطبیت حلال بر محتوای کل فنلیک و فلاونوئید و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه متکا را مقایسه کردند. نتایج نشان داد که روش استخراج و نوع حلال تأثیر معناداری بر ترکیبات مؤثره گیاه دارد.

Goa و Markham (۱۹۹۷) نشان دادند که ژن AGT در سلول‌های کلیه، آنژیوتانسین II تولید می‌کند و والسارتان با مهار عملکرد آنژیوتانسین II منجر به کاهش فشار خون می‌شود. همچنین، Fernandez-Real و همکاران (۲۰۰۱) در مطالعه‌ای بر روی سلول‌های خونی افراد دارای اضافه وزن دریافتند که اختلال در ژن $\text{TNF-}\alpha$ می‌تواند منجر به کاهش حساسیت به انسولین شود که با فشار خون بالا مرتبط است. علاوه‌براین، Ludwig و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که ژن DGAT¹ در سلول‌های

خونی زنان ترکیه با شاخص توده بدن و فشار خون ارتباط دارد. همچنین، Staessen و همکاران (۲۰۰۸) دریافتند که ژن DRD۱ در سلول‌های قشر پیشانی با تنظیم میزان سدیم در بدن، فشار خون را کاهش می‌دهد.

مطالعات پیشین نشان می‌دهد که گیاه متکا حاوی ترکیبات فعال زیستی متعددی از جمله فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی و ترپنوئیدهاست که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدباکتریایی هستند. از سوی دیگر، تحقیقات مختلف تأثیر ژن‌های AGT، AGTR^۲ و ATP^۱A^۱ را در تنظیم فشار خون تأیید کرده‌اند. با این حال، تاکنون مطالعه‌ای به بررسی تأثیر عصاره الکلی گیاه متکا بر بیان این ژن‌ها در سلول‌های کلیه نپرداخته است. بنابراین، این تحقیق می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی اثرات ضد فشارخونی گیاه متکا کمک کند.

۳. روش تحقیق

۳.۱. نوع مطالعه

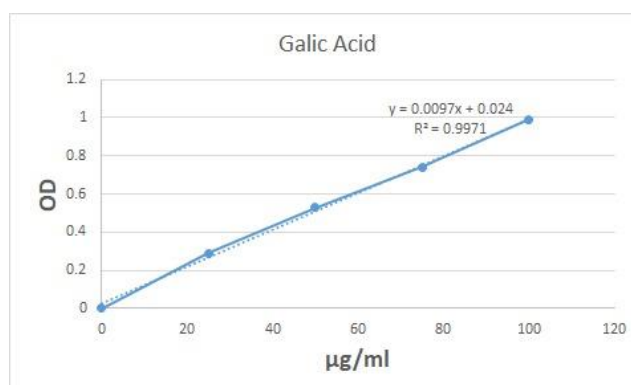
این پژوهش تجربی در تابستان ۱۴۰۲ انجام شد. استخراج عصاره الکلی و اسانس‌های روغنی گیاه و سنجش ترکیبات فنلی در آزمایشگاه دانشگاه آزاد تهران شمال صورت گرفت. آزمایشات مولکولی شامل کشت سلول‌های ACHN، تست‌های MTT و TAC و بررسی بیان ژن‌های Agt، Agtr^۲ و ATP^۱A^۱ در آزمایشگاه ژینوژن پژوهان انجام شد.

۳.۲. تهیه نمونه

نمونه‌ها در زمان گلدهی از رویشگاه موجن (شهر شاهرود) برداشت شد. سلول‌های ACHN IBRC C ۱۰۱۰۵ از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه شد.

۳.۳. تعیین میزان فنل

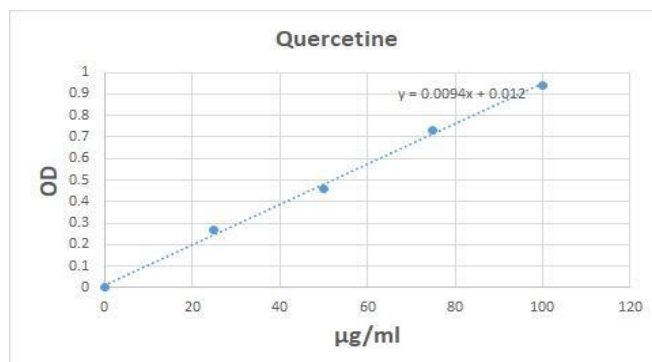
برای سنجش فنل کل از روش ارائه شده توسط Marrinova و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. بر این اساس، ابتدا، ۰/۱ گرم برگ تازه در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره با ۱/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولین (۱۵ بار رقیق‌شده) مخلوط گردید. پس از ۵ دقیقه، ۳ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷٪ اضافه شد و جذب نمونه پس از ۹۰ دقیقه در طول موج ۷۵۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر (مدل PH iller scientific su-۱۶۰۰) خوانده شد. برای استانداردسازی از محلول‌های گالیک اسید با غلظت‌های ۰ تا ۰/۱۲ mg/ml استفاده گردید (نمودار (۱)).



نمودار ۱: منحنی استاندارد گالیک اسید (فنل)

۳. ۴. تعیین میزان فلاونوئید کل

میزان فلاونوئید کل با روش اصلاح شده Chang و همکاران (۲۰۰۲) اندازه گیری شد. در ادامه، مراحل کار تشریح می شود. در این راستا، نخست، ۰/۱ گرم برگ تازه در ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰٪ به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. پس از صاف کردن، ۰/۵ میلی لیتر عصاره با ۱/۵ میلی لیتر اتانول ۹۵٪، ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط شد. محلول به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه گردید. جذب نوری در طول موج ۴۱۵ نانومتر با اسپکتروفوتومتر (مدل Philler scientific SU-۱۶۰۰) خوانده شد. برای استانداردسازی از محلول های کوئرستین با غلظت های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. نمونه بلانک حاوی تمام مواد به جز عصاره بود (نمودار (۲)).



نمودار ۲: منحنی استاندارد کوئرستین

۳. ۵. آنتوسیانین ها

برای اندازه گیری آنتوسیانین ها از روش Nougues و Baker استفاده شد. در این روش، ۱ گرم از بافت تر گیاه در ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (حاوی ۱٪ اسید کلریدریک با نسبت حجمی ۹۹:۱) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از این دوره، نمونه با دور 9×10000 به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و جذب محلول رویی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. غلظت آنتوسیانین ها با استفاده از ضریب خاموشی محاسبه گردید. تمام مراحل در شرایط نوری کنترل شده و با سه تکرار انجام پذیرفت. نمونه های شاهد نیز حاوی تمام معرف ها به جز عصاره گیاهی بودند.

۳. ۶. ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی به وسیله ۲ و ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)

آنتی اکسیدان ها با خنثی سازی رادیکال های آزاد نقش مهمی در حفظ کیفیت مواد غذایی ایفا می کنند. یکی از روش های متداول برای سنجش این فعالیت، استفاده از رادیکال پایدار ۲ و ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) است که یک ترکیب لیپوفیل با جذب بیشینه در ۵۱۵ نانومتر محسوب می شود. این رادیکال در واکنش با آنتی اکسیدان ها کاهش یافته و منجر به کاهش جذب در محدوده ۵۱۵-۵۱۷ نانومتر می گردد.

رادیکال DPPH به عنوان ترکیبی پایدار با رنگ بنفش، در اثر واکنش با ترکیبات دهنده هیدروژن یا الکترون به دی فنیل پیکریل هیدرازین زرد رنگ تبدیل می شود. میزان کاهش جذب نوری محلول، معیاری برای سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی نمونه ها محسوب می شود. در این پژوهش، فعالیت پاکسازی رادیکال های آزاد DPPH بر اساس روش استاندارد Akowuah و همکاران اندازه گیری شد که کاهش مولکول های DPPH را متناسب با تعداد گروه های هیدروکسیل در دسترس ارزیابی می کند.

جدول ۱: اعداد حاصل از ارزیابی DPPH

غلظت ۱۰۰٪	غلظت ۵۰٪	غلظت ۲۵٪	کنترل منفی	تکرار-رقت
۰/۰۲۸	۰/۰۲۱	۰/۰۸۹	۰/۲۹۳	تکرار اول
۰/۰۲۴	۰/۰۲۲	۰/۰۸۲		تکرار دوم
۰/۰۱۷	۰/۰۱۹	۰/۱۲۵		تکرار سوم

۳.۷. تست MTT (کشت سلول و بررسی سمیت سلولی)

جهت کشت سلول از تجهیزات بشر و استوانه مدرج ۱۰۰۰ و ۱۰۰، ۱۰، سمپلر، سر سمپلر آبی، زرد، کریستالی، پیت مدرج ۲، ۵ و ۱۰ ml فلاسک سلولی ۲۵ و ۷۵ cm^۲، پلیت ۶ و ۹۶ خانه، فیلتر ۰/۲ m، دماسنج دیجیتال، سیم پیچ، منبع تغذیه با ولتاژ و جریان متغیر، کرایوتیوپ ml^۲ برای فریز کردن سلول ها، فالكون ۱۵ و ۵۰ ml و فانل ۵۰۰ ml استفاده شد. مهمترین مواد استفاده شده در این تحقیق نیز به شرح بیان شده در جدول (۲) است.

جدول ۲: مواد مورد استفاده برای انجام تست MTT

نام ماده به اختصار	نام کامل	کشور سازنده	شرکت	Cat Number
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium	۱۱۵۷۴۴۸۶	Gibco	United Kingdom
Fetal Bovine Serum	FBS	۱۱۵۷۰۶۳۶	Gibco	United Kingdom
-----	Trypsin/EDTA	۱۱۵۶۰۶۲۶	Gibco	United Kingdom

DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Germany	Sigma	۶۷-۶۸-۵
MTT (۳-(۴,۵-Dimethylthiazol-۲-yl)-۲,۵-Diphenyltetrazolium Bromide)	Germany	Sigma	۲۹۸-۹۳-۱	MTT
Ethanol				
United Kingdom	Gibco	۱۱۵۱۰۵۴۶	PBS Tablet	Phosphate-Buffered Saline
YT۲۵۵۲	یکتاتجهیز	-----	Iran	کیت سایبرگرین
پارس طوس	A۱۰۱۱۶۱	Iran	-----	کیت سنتز cDNA
GeneAll RiboEx	GA-۳۰۱-۰۰۱	Korea	-----	کیت استخراج RNA
DENMARK	AMPLIQON	A۳۲۳۴۰۲	Real Q plus ۲x Master Mix Green	-----
Curcumin	Curcuma Longa	Germany	Sigma	۴۵۸-۳۷-۷
۱۸۰۳۰۱- ۱۸۳۰۳- ۱۸۰۳۰۶	DENMARK	AMPLIQON	Taq DNA Polymerase ۲x Master Mix Red	-----

دستگاه‌های مورد استفاده در این تحقیق نیز شامل هود کلاس ۲ شرکت ژال تجهیز، سانتریفیوژ، شرکت Hettich، بن ماری، شرکت Memmert، ترازو، میکروسکوپ، شرکت AE-Motic، انکوباتور، شرکت Memmert، شیکر، شرکت Heidolph، ورتکس، شرکت Heidolph، الیزا ریدر، شرکت SrcituroBiiketoib، منبع تغذیه، شرکت JBit، دستگاه Real-Time PCR شرکت Rotor-Gene و دستگاه هموژنایزر با امواج Ultrasound، شرکت Handelin می‌باشد.

سلول‌های ACHN IBRC C۱۰۱۰۵ جهت ایجاد و بررسی تمایز سلول استفاده شد. سلول‌ها از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه شد.

در ادامه، به تشریح آماده‌سازی مواد مورد استفاده پرداخته می‌شود.

(۱) نحوه تهیه بافر PBS

قرص PBS در ۱ لیتر آب مقطر و به کمک یک آهنربا حل شد. محلول به یک فائل تمیز منتقل شد و درب آن به صورت نیمه باز گذاشته شد و درون ۲ کیسه فریزر بسته‌بندی شد. سپس به مدت ۴۰ دقیقه با فشار ۱۵۰ psi اتوکلاو شد و بعد از هم دما شدن با محیط به یخچال ۴ درجه سانتی گراد منتقل شد. این بافر برای شست و شوی سلول‌ها استفاده می‌شود.

(۲) آماده‌سازی محلول MTT

برای آماده‌سازی این محلول ۰/۰۰۵ گرم از پودر MTT وزن شده و در ۱ میلی لیتر بافر PBS حل شد. جهت همگن‌تر شدن محلول چند دقیقه ورتکس انجام شد و در نهایت دور میکروتیوپ فویل پیچیده شد و در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

(۳) کشت سلولی

اولین مرحله از کار به منظور استفاده از سلول‌ها در تست‌های مختلف کشت سلولی می‌باشد. آماده‌سازی سلول‌ها جهت استفاده شامل دفریز کردن سلول‌ها، پاساژ دادن آن‌ها و فریز گرفتن از آن‌ها جهت داشتن Back up می‌باشد. در ادامه هر مرحله با جزئیات تشریح می‌شود.

(۴) یخ زدایی سلول‌ها

ابتدا محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS با ترکیب ۴۰۰ میکرولیتر FBS و ۳۶۰۰ میکرولیتر DMEM در فالكون ۱۵ میلی‌لیتری تهیه شد. سلول‌ها با احتیاط از تانک نیتروژن خارج شده و به صورت غیرمستقیم در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا از شوک دمایی جلوگیری شود. پس از ذوب شدن ۷۰٪ سوسپانسیون، محتویات به فالكون حاوی ۴ میلی‌لیتر محیط کشت منتقل شد.

سوسپانسیون سلولی با دور ۲۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از دورریز محلول رویی، ۲ میلی‌لیتر محیط کشت تازه به رسوب سلولی اضافه و با پیپتاژ همگن شد. سپس سوسپانسیون سلولی به فلاسک ۲۵ سانتی‌مترمکعبی حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل منتقل و در انکوباتور با شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی اکسید کربن نگهداری شد.

(۵) پاساژ دادن سلول‌ها جهت افزایش تعداد آن‌ها برای انجام تست‌های مختلف

پاساژ سلولی زمانی انجام می‌شود که تراکم سلول‌ها به حدود ۸۰٪ برسد و نیاز به فضای بیشتری برای رشد داشته باشند. در این فرآیند، ابتدا محیط کشت قدیمی دور ریخته شده و سلول‌ها با ۱ میلی‌لیتر PBS شستشو داده می‌شوند. سپس ۱ میلی‌لیتر محلول تریپسین/EDTA به فلاسک اضافه شده و به مدت ۳-۵ دقیقه در انکوباتور قرار می‌گیرد تا سلول‌ها از کف فلاسک جدا شوند. برای خنثی‌سازی تریپسین، ۲ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۵۰٪ FBS و ۵۰٪ DMEM به فلاسک اضافه می‌گردد.

محتوای فلاسک به فالکون ۱۵ میلی لیتری منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه با دور $200 \times g$ سانتریفوژ می شود. همزمان، ۴ میلی لیتر محیط کشت تازه به فلاسک اصلی اضافه می گردد. پس از سانتریفوژ، محیط رویی دور ریخته شده و رسوب سلولی در ۲ میلی لیتر محیط کشت جدید به صورت سوسپانسیون درمی آید. نهایتاً، ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون به فلاسک اصلی و ۱ میلی لیتر به فلاسک جدید منتقل شده و هر دو در انکوباتور با شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ دی اکسید کربن قرار می گیرند.

۶) مراحل فریز کردن

برای فریز کردن سلول ها، ابتدا فلاسک سلولی از انکوباتور خارج شده و مراحل پاساژ تا مرحله ۶ انجام می شود. سپس سوسپانسیون سلولی آماده شده و در کرایوتیوب های استریل حاوی ۹۰۰ میکرولیتر FBS و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO توزیع می گردد. به هر کرایوتیوب ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی اضافه شده و بلافاصله به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل می شوند. پس از ۱ تا ۲ ساعت، نمونه ها به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد انتقال می یابند. توجه به این نکته ضروری است که DMSO در دمای اتاق برای سلول ها سمی است، اما در دمای ۲۰- و ۷۰- درجه سانتی گراد بی ضرر می باشد، بنابراین انتقال سریع کرایوتیوب ها به فریزر از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

۷) روش انجام آزمون MTT به منظور به دست آوردن IC_{50} یا دوز موثر دارو یا مقدار سمیت نمونه بر روی سلول

هدف از انجام این تست ارزیابی میزان زنده ماندن سلول ها بعد از تیمار آن ها با دارو می باشد. همچنین میزان دوز موثر دارو و غیره از طریق انجام این تست به دست آمد که برای انجام سایر آزمون ها مورد استفاده واقع شد.

۸) آماده سازی دارو و رقت سازی آن ها

داربست ها در سایز یکسان ۵/۵۰/۵۰ برش داده شد، توسط UV استریل شدند. سپس، در آزمون ها استفاده شد.

۳.۷.۱. آزمون MTT سلول های ACHN IBRC C10105

ابتدا سوسپانسیون سلولی ACHN (کد IBRC C10105) طبق پروتکل استاندارد پاساژ تا مرحله ۶ آماده شد. سلول ها پس از شمارش با لام نئوبار، با تراکم ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند تا چسبندگی و پایداری لازم را کسب کنند. پس از این دوره، محیط کشت تعویض و سلول ها با داربست های مورد نظر تیمار شدند، درحالی که چاهک های کنترل تنها ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه دریافت کردند. پلیت ها برای بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور باقی ماندند.

پس از اتمام دوره های انکوباسیون، محیط کشت هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر محلول جایگزین شد و پلیت به مدت ۵-۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفت تا بلورهای بنفش تشکیل شوند. سپس محیط رویی به دقت برداشته و ۷۰-۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. پلیت به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت تا بلورها کاملاً حل شوند. جذب نوری محلول ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد و داده ها در نرم افزار Excel تحلیل گردید تا درصد زندهمانی سلول ها محاسبه شود.

۳.۸. تست TAC (ظرفیت تام آنتی اکسیدانی)

آنتی اکسیدان‌ها به عنوان اولین خط دفاعی بدن در برابر رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند که نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو دارند. ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAC) معیاری برای سنجش کل ترکیبات آنتی اکسیدانی در نمونه‌های بیولوژیک است و تغییرات آن می‌تواند نشان‌دهنده خطر ابتلا به بیماری‌های ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد باشد. در این آزمایش، یون‌های مس (Cu^{2+}) در حضور آنتی اکسیدان‌ها به Cu^{1+} احیا شده و با کروموژن واکنش می‌دهند که منجر به تشکیل رنگ قابل اندازه‌گیری در طول موج ۴۵۰ نانومتر می‌شود. از مزایای این روش می‌توان به توانایی سنجش طیف وسیعی از آنتی اکسیدان‌ها از جمله تیول‌ها اشاره کرد که در روش‌های دیگر مانند FRAP (بر پایه آهن) قابل اندازه‌گیری نیستند. شدت جذب نور در این طول موج با غلظت آنتی اکسیدان‌ها در نمونه رابطه مستقیم دارد.

الف) اطلاعات کلی و محتویات

در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شود. حمل توسط یخ مرطوب انجام می‌شود. Trolox Standard در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌شود. محدوده اندازه‌گیری دینامیک، ۴۰۰-۴۰ nmol/ml و حساسیت، ۲۰ nmol/ml Trolox Standard است.

جدول ۳: مواد مورد استفاده در آزمون TAC

مطلوب	حداکثر	نمونه
۲۰ میلی گرم	۳۰ میلی گرم	Tissues from animal/plant
$1 \times 10^6 - 5 \times 10^5$	$1/5 \times 10^6$	Cells
۵-۱۰ میکرولیتر	۱۰ میکرولیتر	Serum

جدول ۴: محتویات کیت TAC

شماره	ماده	مقدار/تعداد
۱	TAC Buffer	۲۰ میلی لیتر
۲	Cu^{2+} Solution	۰/۲ میلی لیتر
۳	Chromogen	۰/۲ میلی لیتر
۴	Trolox Standard	پودر
۵	TAC DMSO	۱۰۰ میکرولیتر

(ب) مواد مورد نیاز اضافی

از مهمترین موارد مورد نیاز اضافی می‌توان به ست سمپلر متغیر و چند کاناله، سر سمپلر مناسب، میکروتیوب ۱/۵ میلی متری، سانتریفیوژ دور بالا (۱۲۰۰۰RPM)، آب دیونیزه، دستگاه Plate Reader با طول موج ۴۵۰ و بافر PBS اشاره نمود.

ج) آماده‌سازی نمونه

۱. آماده‌سازی نمونه بافتی

۱۰-۲۰ میلی گرم از بافت با استفاده از سونیکاتور یا هموژنایزر در بافر PBS هموژنیزه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ می‌شود. سوپرناتانت حاصل در تیوب جدید جمع‌آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌شود. برای لیز کامل سلول‌ها، پس از تریپسینیزاسیون و سانتریفیوژ، رسوب سلولی ۳ بار در بافر PBS فریز-دفریز می‌شود.

۲. آماده‌سازی نمونه سرمی

خون در تیوب بدون ضد انعقاد جمع‌آوری و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می‌شود تا لخته تشکیل شود. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰g سانتریفیوژ شده و سرم زرد رنگ با دقت و بدون آسیب‌رساندن لایه بافی (لکوسیت‌ها) برداشته شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری می‌شود.

د) آماده‌سازی کیت و استاندارد

محلول کاری TAC برای هر نمونه یا استاندارد شامل ۱۵۰ μL TAC Buffer، ۲ μL Cu^{2+} Solution و ۲ μL Chromogen می‌باشد.

ه) آماده‌سازی استاندارد

ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول TAC DMSO به ویال حاوی پودر Trolox اضافه و کاملاً مخلوط می‌شود تا محلول یکنواختی حاصل شود. این محلول در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری تقسیم‌بندی و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا ۴ ماه قابل نگهداری است.

جدول ۵: آماده‌سازی استانداردها

غلظت Trolox (nmol/ml)	محلول استاندارد (۱ mM) (μL)	PBS (μL)	حجم نهایی (μL)
۰	۰	۱۰۰	۱۰۰
۴۰	۴	۹۶	۱۰۰
۸۰	۸	۹۲	۱۰۰
۱۶۰	۱۶	۸۴	۱۰۰
۲۰۰	۲۰	۸۰	۱۰۰

۱۰۰	۶۰	۴۰	۴۰۰
-----	----	----	-----

برای تهیه محلول استاندارد ۱ میلی مولار، ۲۵ میکرولیتر از محلول Trolox را با ۹۷۵ میکرولیتر PBS مخلوط می کنیم. محلول حاصل نیز در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۴ ماه قابل استفاده می باشد.

(و نحوه انجام آزمایش

ابتدا ۳۰ میکرولیتر از نمونه یا استاندارد (به صورت دوتایی) به هر چاهک اضافه می شود. به چاهک بلانک نیز ۳۰ میکرولیتر PBS بافر افزوده می شود. سپس ۱۵۰ میکرولیتر محلول کاری TAC به تمام چاهک ها اضافه شده و پلیت به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می شود. در نهایت، جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شده و داده ها با استفاده از نرم افزار Excel تحلیل و نمودارهای مربوطه رسم می گردند.

۹.۳. بررسی تأثیر عصاره فنلی و اسانس های روغنی بر بیان ژن ها

برای بررسی کمی بیان ژن ها، ابتدا می بایست mRNA مربوط به هر ژن را استخراج نمود. با توجه به ناپایداری ساختار mRNA، کلیه مراحل استخراج باید با دقت و با استفاده از وسایل عاری از RNase و DNase انجام شود. در این مطالعه، RNA تام سلولی از سلول های تیمار شده با استفاده از کیت RiboEX (شماره کاتالوگ: ۳۰۲-۰۰۱) ساخت شرکت GeneALL کره جنوبی استخراج گردید.

۹.۳.۱. روش استخراج RNA

ابتدا نمونه بافتی (۱۰۰ میلی گرم) یا سلولی (۱۰^۶×۵ سلول) در ۷۰۰ میکرولیتر محلول RiboEx لیز شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری می شود. پس از اطمینان از کامل شدن فرآیند لیز، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد اضافه و نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ می شود. در این مرحله سه فاز تشکیل می شود که فاز آبی حاوی RNA به میکروتیوب جدید منتقل شده و با حجم برابر ایزوپروپانول سرد مخلوط می گردد. نمونه پس از سروته کردن چندباره، به مدت ۱ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می شود.

پس از سانتریفیوژ مجدد (۱۰۰۰۰ دور، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد، سوپرناتانت تخلیه شده و رسوب با ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵٪ سرد شستشو داده می شود. نمونه مجدداً سانتریفیوژ شده و پس از تخلیه سوپرناتانت، RNA به مدت کوتاهی در معرض هوا قرار می گیرد تا نیمه خشک شود. در نهایت، رسوب RNA در ۵۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل شده و نمونه در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری می شود تا برای مراحل بعدی آماده باشد.

۹.۳.۲. ارزیابی کیفیت RNA

برای تعیین کمیت و کیفیت RNA، از دستگاه نانودراپ استفاده شد که با اندازه گیری جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ نانومتر (جذب اسیدهای نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (جذب پروتئین) عمل می کند. نسبت های جذبی ۲۸۰/۲۶۰ در محدوده ۱.۸-۲.۲ و

۲۳۰/۲۶۰ در بازه ۱/۷-۱/۹ نشان‌دهنده RNA خالص و مناسب برای سنتز cDNA بودند. نمونه‌های ما در این محدوده قرار داشتند که گویای کیفیت مطلوب RNA استخراج شده می‌باشد.

۳.۹.۳. سنتز cDNA

در واکنش Real-Time RT-PCR، RNA به عنوان الگو به cDNA تبدیل می‌شود. این فرآیند با اتصال پرایمرها به RNA آغاز شده و آنزیم رونویسی معکوس، رشته DNA مکمل (cDNA) را سنتز می‌کند. cDNA حاوی توالی‌های رمزگذار پیوسته ژن‌ها بوده و برای مطالعات بعدی مناسب است. در این پژوهش از کیت Easy cDNA Synthesis Kit (شماره کاتالوگ: A۱۰۱۱۶۱) ساخت شرکت پارس توس استفاده شد.

سه نوع پرایمر اصلی برای سنتز cDNA به کار می‌رود: (۱) Oligo (dT) نوکلئوتیدی که به دم پلی A mRNA متصل می‌شود، (۲) پرایمرهای تصادفی که قابلیت اتصال به هر نقطه‌ای از RNA را دارند، و (۳) پرایمرهای اختصاصی (حدود ۲۱ نوکلئوتید یا بیشتر) که برای رونویسی معکوس بخش‌های خاصی از mRNA طراحی شده‌اند. در این مطالعه از ترکیب این پرایمرها برای دستیابی به کارایی بهینه استفاده گردید.

۳.۹.۴. روش کار برای سنتز cDNA

روش سنتز cDNA: تمام مراحل آزمایش بر روی یخ انجام شد. برای هر نمونه، مخلوطی حاوی ۱ میکرولیتر پرایمر Random، ۱ میکرولیتر پرایمر Oligo dT، ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۳ میکرولیتر RNA در میکروتیوب ۰.۲ میلی‌لیتری استریل تهیه شد تا حجم نهایی به ۱۰ میکرولیتر برسد. نمونه ابتدا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه انکوبه شد تا ساختارهای ثانویه RNA باز شود، سپس سریعاً روی یخ قرار گرفت. پس از سرد شدن، ۱۰ میکرولیتر از محلول بافر حاوی آنزیم رونوشت‌بردار معکوس اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. واکنش در ترموسایکلر با برنامه دمایی مشخص انجام شد: ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای اتصال پرایمرها، ۵۰ درجه به مدت ۶۰ دقیقه برای سنتز cDNA و ۷۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه برای غیرفعال کردن آنزیم.

جدول ۶: برنامه دما - زمان برای واکنش cDNA

مرحله	حرارت (درجه سانتی‌گراد)	زمان
اتصال پرایمر	۲۵	۱۰ دقیقه
سنتز cDNA	۵۰	۶۰ دقیقه
غیرفعال سازی آنزیم	۷۰	۱۰ دقیقه

۳.۹.۵. طراحی پرایمر

پرایمرها الیگونوکلئوتیدهای کوتاهی هستند که با اتصال اختصاصی به توالی‌های مکمل DNA الگو، آغاز سنتز DNA را امکان‌پذیر می‌کنند. یک پرایمر مناسب باید دارای ویژگی‌های زیر باشد: طول ۱۸-۳۰ نوکلئوتید برای اتصال اختصاصی، محتوای

GC بین ۳۰-۶۰٪، فاقد توالی‌های تکراری یا ساختار ثانویه، و بدون اتصال خودی در انتهای ۳' که منجر به تشکیل پرایمر دایمر نشود. همچنین دمای ذوب (Tm) پرایمرها باید حدود ۶۰ درجه سانتیگراد باشد و حداکثر اختلاف ۲ درجه بین Tm جفت پرایمرها مجاز است. انتهای ۳' نیز نباید بیش از دو نوکلئوتید G یا C داشته باشد تا از اتصال ناخواسته جلوگیری شود. در این تحقیق، توالی‌های ژن‌های ETV-۵، c-RET، gfr α ۱، GDNF و ژن مرجع GAPDH از پایگاه داده NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استخراج شد. پرایمرهای اختصاصی برای این ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenRunner طراحی گردیدند تا تمام معیارهای ذکر شده برای یک پرایمر بهینه را دارا باشند.

۳. ۹. ۶. Real-Time PCR

Real-Time به معنای مشاهده لحظه به لحظه یک فرایند می‌باشد. مشکلات و نواقص عدیده موجود در نقطه پایانی PCR همراه با نیاز به یک روش تعیین کمی دقیق زمینه گشایش عرصه‌ای نوین در تکنیک PCR گردید.

جدول ۷: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر
Agt	TGGACAGCACCTGGCTTTCAA	۲۲
ATP α ۱	GGCAGTGTTCAGGCTAACCAG	۲۲
Agtr β	TATGGCCTGTTTGTCTCAT	۲۰
GAPDH	CGACTTCAACAGCGACTCAC	۲۲

۳. ۹. ۷. روش‌های شناسایی اسید نوکلئیک به وسیله Real – Time PCR

در این مطالعه از سه روش اصلی شناسایی مبتنی بر رنگ‌های فلورسنت استفاده شد که در آن‌ها سیگنال فلورسانس متناسب با افزایش محصولات PCR تقویت می‌شود. متداول‌ترین روش، استفاده از رنگ سایبرگرین است که با اتصال به DNA دو رشته‌ای در شیار کوچک، موجب افزایش ناگهانی فلورسانس می‌گردد. برای سنجش کمی نسبی بیان ژن‌ها، نسبت بیان ژن هدف به ژن مرجع (GAPDH) محاسبه شد که در این روش برابری بازده تکثیر هر دو ژن برای جلوگیری از خطا ضروری است.

۳. ۹. ۸. روش انجام Real – Time PCR

در این مطالعه از کیت ۲X YTA SYBR Green QPCR Master Mix استفاده شد که نمونه‌ها روی یخ و دور از نور مستقیم آماده شدند. در کنترل منفی (بدون الگو) به جای RNA آب دیونیزه اضافه گردید. تیوب‌ها به دقت بسته شدند تا از تبخیر جلوگیری شود. واکنش‌ها در دستگاه RotorGene ۶۰۰۰ (شرکت QIAGEN) با برنامه دمایی سه مرحله‌ای شامل دناتوراسیون، اتصال پرایمر و گسترش انجام شد. این روش امکان سنجش کمی محصولات PCR را با حساسیت بالا فراهم می‌کند.

۳. ۹. ۹. مواد مورد نیاز برای انجام Real - Time PCR

پروتکل Real-Time PCR با SYBR Green برای انجام واکنش، مخلوطی حاوی ۱۰ میکرولیتر بافر SYBR RT-PCR، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (Forward و Reverse)، ۳ میکرولیتر cDNA و ۶ میکرولیتر آب دیونیزه عاری از RNase تهیه شد. برنامه دمایی دستگاه در سه مرحله تنظیم گردید: (۱) فعال‌سازی آنزیم در ۹۵ درجه به مدت ۴ دقیقه، (۲) ۴۰ سیکل شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، و (۳) مرحله نهایی توسعه محصول در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه به منظور ترسیم منحنی ذوب. این روش امکان بررسی کمی و کیفی محصولات PCR را فراهم می‌کند.

۳. ۹. ۱۰. تنظیم غلظت پرایمرها

بهینه‌سازی غلظت پرایمرها از طریق تست رقت‌های متوالی انجام می‌شود، چرا که مقادیر اضافی پرایمر می‌تواند منجر به تشکیل پرایمر دایمر گردد. این محصولات ناخواسته با اتصال رنگ سایبرگرین به الیگونوکلوئوتیدهای دو رشته‌ای، سیگنال فلورسانس ایجاد می‌کنند که در منحنی ذوب به صورت پیک‌های دمایی پایین‌تر از محصول اصلی ظاهر می‌شوند. برای اطمینان از اختصاصیت واکنش، کنترل‌های منفی به صورت جداگانه برای هر جفت پرایمر در نظر گرفته می‌شوند تا هرگونه آلودگی احتمالی یا تشکیل محصولات غیراختصاصی شناسایی شود. این کنترل‌های کیفی برای تفسیر صحیح نتایج PCR ضروری هستند.

۳. ۹. ۱۱. روش تعیین کمی بیان ژن با Real - Time PCR

Real-Time PCR روشی دقیق برای تعیین کمی بیان ژن‌هاست که در آن از روش کمیت‌سنجی نسبی استفاده می‌شود. در این روش، سیکل آستانه (CT) که محل تقاطع منحنی تکثیر با خط آستانه است، معیار اصلی محاسبه بیان ژن محسوب می‌شود؛ به‌طوری که CT کوچکتر نشان‌دهنده مقدار اولیه بیشتر DNA هدف است. رنگ SYBR Green با اتصال به DNA دو رشته‌ای و تولید فلورسانس، امکان شناسایی و محاسبه CT را فراهم می‌کند. نتایج به صورت تغییرات افزایشی یا کاهشی بیان ژن هدف نسبت به گروه کنترل و با استفاده از روش‌های مختلف تحلیل داده‌های CT گزارش می‌شود.

۳. ۹. ۱۲. تکثیر اختصاصی محصولات Real-Time PCR توسط ژل الکتروفورز

محصولات تکثیر شده ژن هدف و مرجع طی Real - Time PCR روی ژل آگارز ۲٪ بارگذاری و الکتروفورز شد. این مرحله جهت تأیید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیراختصاصی انجام می‌گیرد.

۳. ۹. ۱۳. ژل الکتروفورز

این روش برای تأیید تکثیر قطعات اختصاصی ژن و بررسی عدم وجود محصولات غیراختصاصی به کار می‌رود. پس از استخراج DNA و تکثیر قطعه موردنظر، مولکول‌های باردار DNA در میدان الکتریکی قرار می‌گیرند و بر اساس اندازه و بار به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. از ژل آگارز به عنوان محیط نیمه جامد استفاده می‌شود که با توجه به غلظت آن و تخلخل موجود، امکان تفکیک مولکول‌ها بر اساس اندازه فراهم می‌گردد. اندازه قطعات با مقایسه با لدر استاندارد (که حاوی قطعات DNA با

اندازه‌های مشخص است) تعیین می‌شود. این روش به دلیل سادگی، سرعت و قدرت تفکیک مناسب، به طور گسترده برای تحلیل محصولات PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۳.۹.۱۴. وسایل و مواد لازم و روش آماده‌سازی

برای انجام الکتروفورز، ابتدا مواد مورد نیاز شامل بافر ۰.۵X TBE، پودر آگارز، رنگ Green-viewer، لودینگ دای و لدر bp۱۰۰ آماده شد. مقدار مشخصی از پودر آگارز با بافر TBE مخلوط و در ماکروویو تا حل شدن کامل حرارت داده شد. پس از خنک شدن، رنگ Green-viewer به ژل اضافه و کاملاً مخلوط گردید. این مخلوط به ظرف مخصوص ژل که حاوی شانه بود ریخته شد تا سفت شود.

پس از سفت شدن ژل، آن را در تانک الکتروفورز قرار داده و بافر TBE اضافه شد تا سطح ژل را بپوشاند. نمونه‌ها پس از بارگذاری در چاهک‌ها، تحت ولتاژ ۱۲۰ ولت قرار گرفتند. در نهایت، نتایج با استفاده از دستگاه Gel Documentation ثبت و عکسبرداری شدند. این روش امکان جداسازی و مشاهده قطعات DNA را به صورت واضح فراهم می‌کند.

۳.۹.۱۵. متغیرها

در مطالعه حاضر متغیرهای سلول سرطانی کلیه رده ACHN IBRC C۱۰۱۰۵، بیان ژن‌های AGT، AGTR^۲ و ATP^۱A^۱ و اسانس‌های روغنی و عصاره خشک گیاه فرولا پرسیکا (متکا) ارزیابی شد. در این پژوهش از ژن GAPDH به عنوان ژن رفرنس استفاده شده و سه گروه که شامل اسانس، عصاره و گروه کنترل هستند، در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

۳.۹.۱۶. روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها پس از جمع‌آوری وارد نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ شد. برای توصیف داده‌ها از آمار توصیفی (میانگین و انحراف معیار) و برای تحلیل آن‌ها از آمار تحلیلی (واریانس یک طرفه) استفاده شد. داده‌ها در سطح معنی داری ۵ درصد مورد آنالیز قرار گرفت.

۴. نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات شیمیایی گیاه فرولا پرسیکا (متکا)

۴.۱. ترکیبات فنلی

مقدار فنل کل (بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید)، مقدار فلاونوئید کل (بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین) و مقدار آنتوسیانین کل محاسبه و نتایج به دست آمده در جدول (۸) ارائه شده است.

جدول ۸: میانگین فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین عصاره الکلی سرشاخه گلدار متکا

فنل کل	فلاونوئید کل ($\mu\text{g Quercetin/gDW}$)	آنتوسیانین ($\mu\text{M/gDW}$)	DPPH (mg/gDW)
--------	---	-------------------------------------	-----------------------------

			(mg Galic acid/gDW)
2.06 ± 0.06	21.18 ± 1.2	69.84 ± 7.3	19.49 ± 1.92

۴. ۲. بررسی تأثیر عصاره فنلی و اسانس‌های روغنی در زنده مانی سلول‌های کلیه رده ACHN IBRC C ۱۰۱۰۵ به وسیله آزمون MTT

به منظور بررسی اثر عصاره فنلی و اسانس‌های روغنی بر زنده مانی سلول‌های سرطانی کلیه رده ACHN IBRC C ۱۰۱۰۵ از آزمون MTT استفاده شد. این روش یک تست میتوکندریایی است و بر اساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است.

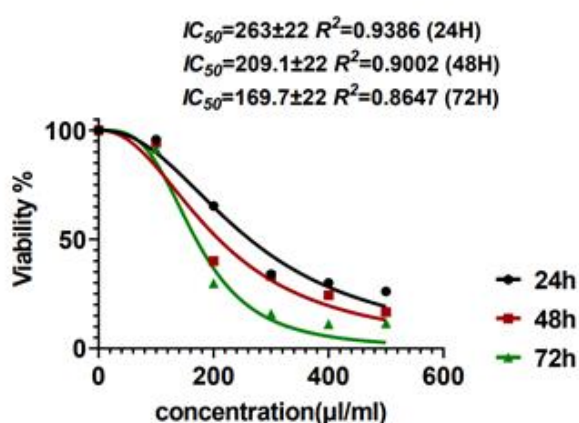
۴. ۲. ۱. تأثیر عصاره فنلی

نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت و زمان تیمار سلول‌ها با عصاره فنلی گیاه فرولا پرسیکا (متکا)، میانگین درصد سلول‌های زنده کاهش معنی‌داری یافت. اعداد محاسبه شده IC_{50} قابل مشاهده است. این اعداد در طی مدت زمان مشخص شده به شدت کم شده و روند کاهش سلول‌های سرطانی رو به بهبود بوده است.

جدول ۹: نتایج تأثیر عصاره فنلی گیاه فرولا پرسیکا بر روی سلول‌های سرطانی کلیه رده ACHN IBRC C ۱۰۱۰۵

زمان	IC_{50}	R^2
۲۴ ساعت	263 ± 22	0.9386
۴۸ ساعت	209.1 ± 22	0.9002
۷۲ ساعت	169.7 ± 22	0.8647

Extract



نمودار ۱: تأثیر عصاره فنلی گیاه فرولا پرسیکا بر روی سلول‌های سرطانی کلیه رده ACHN IBRC C ۱۰۱۰۵

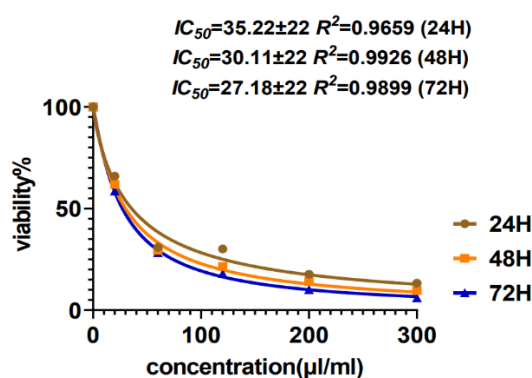
۴. ۲. ۲. بررسی تأثیر اسانس‌های روغنی با آزمون MTT

به منظور بررسی اثر اسانس روغنی بر زنده مانی سلول‌های سرطانی رده ACHN IBRC C10105 از آزمون MTT استفاده شد. بررسی نمودار (۲) نشان می‌دهد که با افزایش غلظت و زمان تیمار اسانس‌های روغنی میانگین درصد زنده مانی کاهش معنی‌داری یافته است.

جدول ۱۰: نتایج تأثیر اسانس‌های روغنی گیاه فرولا پرسیکا بر روی سلول‌های سرطانی کلیه رده ACHN IBRC C10105

زمان	IC ₅₀	R ^۲
۲۴ ساعت	۳۵/۲۲±۲۲	۰/۹۶۵۹
۴۸ ساعت	۳۰/۱۱±۲۲	۰/۹۹۲۶
۷۲ ساعت	۲۷/۱۸±۲۲	۰/۹۸۹۹

Essential oil



نمودار ۲: تأثیر اسانس‌های روغنی گیاه فرولا پرسیکا بر روی سلول‌های سرطانی کلیه رده ACHN IBRC C10105

مقایسه IC₅₀ زنده مانی در دو تیمار عصاره فنلی و اسانس‌های روغنی نشان داد که اسانس‌های روغنی در کاهش سرعت رشد سلول‌های سرطانی نقش دارند.

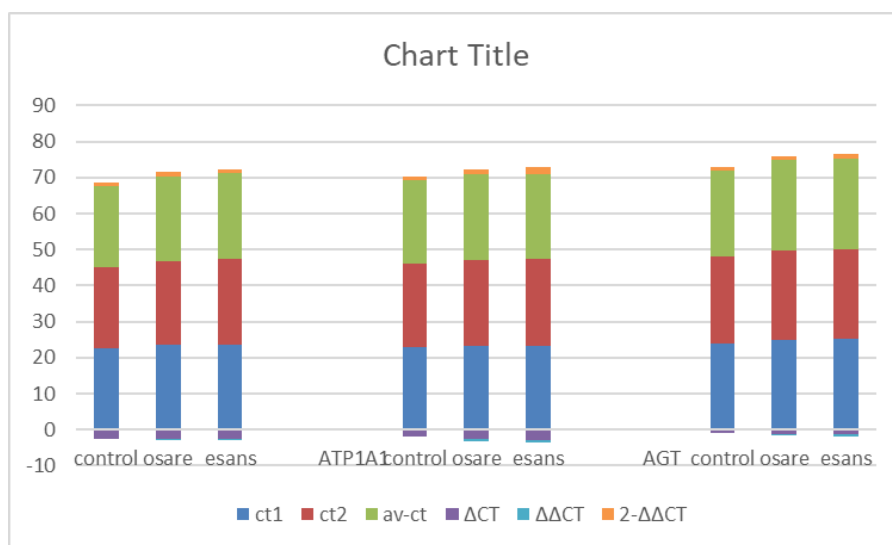
۳.۴. نتایج حاصل از عصاره فنلی و اسانس‌های روغنی بر بیان ژن‌های AGT، AGTR^۲ و ATP^{۱A}

نتایج جدول (۱۱) نشان می‌دهد که عصاره فنلی و اسانس‌های روغنی گیاه فرولا پرسیکا (متکا) سبب افزایش بیان سه ژن AGT، AGTR^۲ و ATP^{۱A} در کلیه شده و در نتیجه افزایش بیان این سه ژن، فشارخون کاهش پیدا می‌کند. همچنین، با توجه به نتایج ارائه شده در این جدول می‌توان نتیجه گرفت که اثر اسانس‌های روغنی این گیاه نسبت به عصاره فنلی بر بیان این سه ژن بیشتر بوده است.

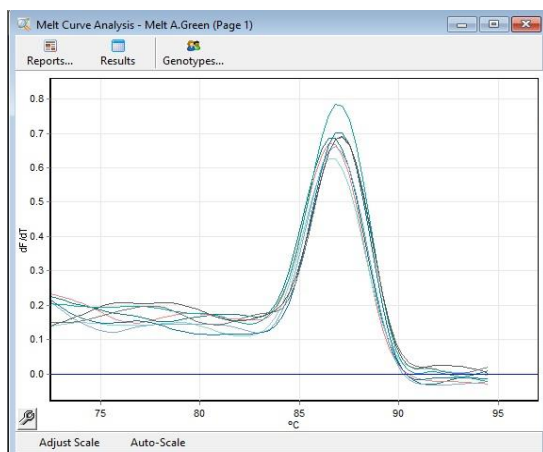
جدول ۱۱: اثر عصاره فنلی و اسانس‌های روغنی بر بیان ژن‌های AGT، AGTR^۲ و ATP^{۱A}

AGTR ²	ct1	ct2	av-ct	ΔCT	ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
control	22.49	22.47	22.48	-2.455	0	1
osare	23.47	23.44	23.455	-2.695	-0.24	1.180993
esans	23.67	23.74	23.705	-2.73	-0.275	1.209994
ATP1A1						
control	23.07	23.04	23.055	-1.88	0	1
osare	23.25	23.93	23.59	-2.56	-0.68	1.60214
esans	23.36	23.92	23.64	-2.795	-0.915	1.885569
AGT						
control	24.01	23.98	23.995	-0.94	0	1
osare	24.89	24.98	24.935	-1.215	-0.275	1.209994
esans	25.18	24.95	25.065	-1.37	-0.43	1.347234

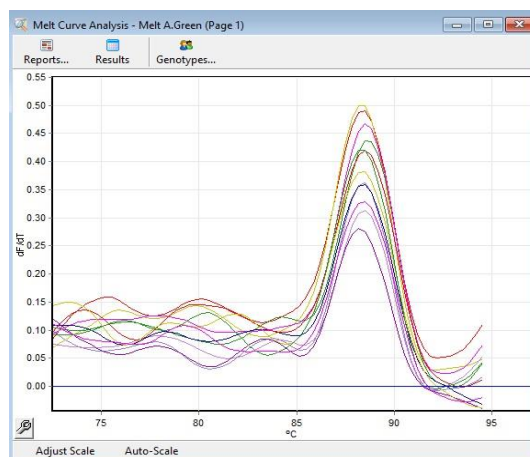
در نمودار (۳) نتایج مربوط به مقایسه نسبت بیان سه ژن AGT²، AGTR² و ATP1A¹ در دو گروه اسانس و عصاره فرولا پرسیکا نمایش داده شده است. با توجه به این نمودار تأثیر اسانس بر بیان ژن AGT نسبت به دو ژن دیگر بیشتر بوده است.



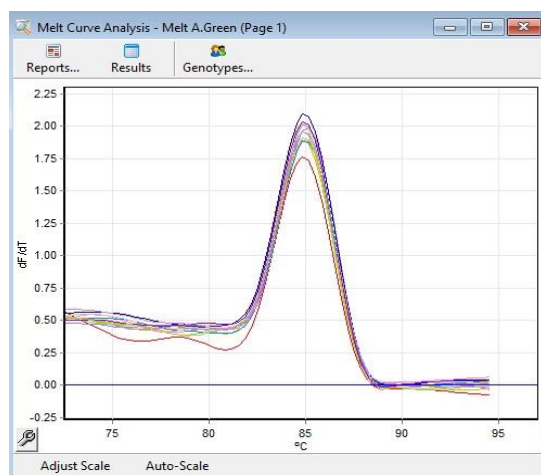
نمودار ۳: نتایج مربوط به مقایسه نسبت بیان سه ژن AGT²، AGTR² و ATP1A¹



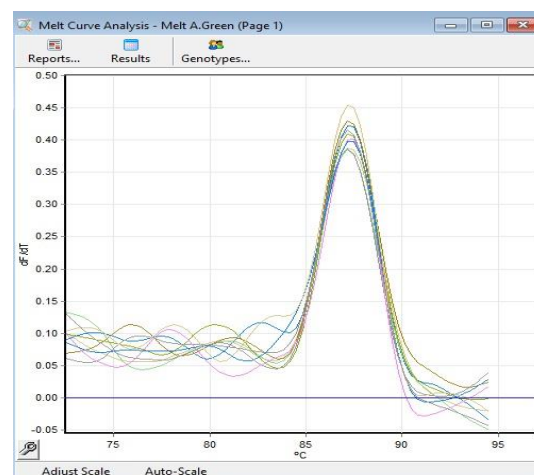
نمودار ۵: منحنی ذوب ژن AGT



نمودار ۴: منحنی ذوب ژن GAPDH



نمودار ۷: منحنی ذوب ژن $ATP1A1$



نمودار ۶: منحنی ذوب ژن $AGTR2$

در نمودارهای ۴ تا ۷، روند تغییرات حاصل از تکثیر ژنهای $ATP1A1$ ، $AGTR2$ ، AGT ، $GAPDH$ نمایش داده شده است. این نمودارها منحنی ذوب ژن‌ها را نمایش می‌دهند. محور عمودی نشان دهنده مشتق فلورسنت به مشتق زمان و محور افقی نشان دهنده درجه سانتی گراد است.

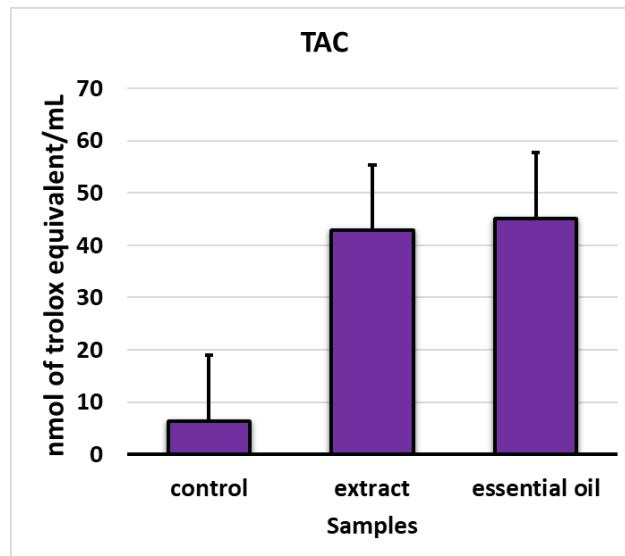
۴. ۴. نتایج حاصل از بررسی ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAC) بر روی عصاره فنلی و اسانس‌های روغنی گیاه فرولا پرسیکا

نتایج جدول (۱۲) نشان می‌دهد که عصاره فنلی و اسانس‌های روغنی گیاه فرولا پرسیکا دارای اثر آنتی اکسیدانی بوده و موجب کاهش رادیکال‌های آزاد در بدن می‌شوند.

جدول ۱۲: روند افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره فنلی و اسانس‌های روغنی در آزمون TAC

Samples	nMol	SE
control	6.35	0.0026458
extract	42.85	0.0015275
essential oil	45.183333	0.0037565

همانطور که در نمودار مشخص است، خاصیت آنتی اکسیدانی اسانس‌های روغنی به نسبت عصاره فنلی بیشتر است.



نمودار ۸: نتایج آزمون TAC بر روی عصاره فنی و اسانس‌های روغنی گیاه فرولا پرسیکا

۵. بحث

فشارخون بالا یکی از مهم‌ترین عوامل تهدیدکننده سلامت انسان است که تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی ایجاد می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر عصاره الکلی گیاه متکا بر بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با فشارخون ($AGTR^2$ ، AGT ، ATP^1A^1) در سلول‌های کلیه انجام شد. این ژن‌ها در سیستم رنین-آنژیوتانسین (RAS) نقش دارند که تنظیم‌کننده اصلی فشارخون و تعادل الکترولیتی است.

سیستم RAS با کنترل عملکرد کلیه، قلب و عروق، نقش محوری در پاتوژنز فشارخون دارد. مهار این سیستم از طریق داروهایی مانند مهارکننده‌های ACE ، ARB ها (مانند لوسارتان و والسارتان) و آنتاگونیست‌های آلدوسترون، روش اصلی درمان فشارخون محسوب می‌شود. این داروها با تأثیر بر ژن‌های AGT و $AGTR^2$ موجب کاهش فشارخون می‌شوند.

سه ژن مورد مطالعه هرکدام نقش منحصر به فردی در کنترل فشارخون دارند:

(۱) ژن AGT در تولید آنژیوتانسینوزن نقش دارد.

(۲) ژن $AGTR^2$ به عنوان رسپتور آنژیوتانسین II عمل می‌کند.

(۳) ژن ATP^1A^1 در عملکرد پمپ سدیم-پتاسیم مؤثر است.

گیاه متکا با تأثیر همزمان بر این سه ژن، می‌تواند گزینه‌ای امیدوارکننده برای کنترل فشارخون باشد.

متکا از خانواده چتریان، حاوی ترکیبات فعالی مانند ترپنوئیدها، کومارین‌ها و ترکیبات فنی است که خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی دارند. مطالعات نشان داده‌اند که عصاره این گیاه می‌تواند مشابه داروهای شیمیایی بر سیستم RAS تأثیر بگذارد و از طریق مهار رادیکال‌های آزاد به کاهش استرس اکسیداتیو کمک کند.

یافته‌ها نشان داد که عصاره متکا بر بیان هر سه ژن هدف تأثیر معناداری دارد و می‌تواند به عنوان یک گزینه درمانی مکمل در کنترل فشارخون مورد توجه قرار گیرد. این مطالعه راه را برای تحقیقات بیشتر درباره مکانیسم‌های مولکولی اثرات ضد فشارخونی گیاهان دارویی هموار می‌کند.

۶. نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که گیاه متکا از خانواده چتریان با تأثیر بر سه ژن کلیدی مرتبط با فشارخون (AGT ، $AGTR^2$ و ATP^1A^1) در کلیه، می‌تواند به عنوان یک گزینه طبیعی و کم‌عارضه برای کنترل فشارخون مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به پراکنش گسترده این گیاه در مناطق مختلف ایران و سابقه طولانی استفاده از آن در طب سنتی، توسعه داروهای گیاهی بر پایه متکا می‌تواند ضمن کاهش وابستگی به داروهای شیمیایی پرعارضه، به بهبود سلامت جامعه کمک کند. استفاده از گیاه متکا در صنعت داروسازی کشور می‌تواند موجب کاهش هزینه‌های واردات داروهای شیمیایی و ایجاد درآمد از طریق تولید و صادرات شود. با توجه به انحصار این گیاه در ایران و برخی کشورهای خاورمیانه، سرمایه‌گذاری در تحقیقات بیشتر و تولید انبوه داروهای گیاهی بر پایه متکا، نه تنها می‌تواند نیاز داخلی را تأمین کند، بلکه فرصتی برای حضور در بازارهای جهانی و کاهش مصرف داروهای شیمیایی در سطح بین‌المللی فراهم خواهد آورد.

۷. منابع

۱. رضایی، محمدباقر؛ برنارد، فرانسواز؛ شفعی دارابی، سیداحمد. (۱۳۸۱). باریجه. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۱۷، ۱-۳.
۲. اذنانی، سیدمهدی؛ بشری، حسین؛ باقری، حسین. (۱۳۸۴). بررسی ویژگی‌های رویشی و برخی ترکیب‌های شیمیایی گیاه *Ferula gummosa* Boiss در استان قم. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۱(۲)، ۱۹۵-۲۱۱.
۳. مرتضایی‌نژاد، فروغ؛ صادقیان، محمدمهدی. (۱۳۸۶). مقایسه ترکیبات مؤثره گیاه دارویی باریجه (*Ferula gummosa* Boiss) در سه منطقه شهرستان کاشان. نشریه پژوهش در علوم کشاورزی، ۳(۲)، ۱۷۲-۱۷۷.
۴. جدیدی، مجید؛ وفایی، عباسعلی؛ میالیدی گرجی، حسین؛ بابایی سعیدآبادی، اکرم. (۱۳۸۹). بررسی اثر عصاره گیاه سکینه (*Ferula persica* L.) بر علائم ناشی از قطع مورفین و دوره خواب در موش سوری. مجله پژوهش در پزشکی، ۳۴(۴)، ۲۲۵-۲۳۰.
۵. مظفری، سمیه؛ رضوی، مهدی؛ قاسمیان، علیرضا؛ ایمانزاده، غلامحسین. (۱۳۹۱). یک مشتق کومارینی از گیاه *Ferula persica* سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (گیاهی، دامی و صنعتی)، مشهد.
۶. امرایی، عباس؛ گیمدیل، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی دانشگاه فر. (۱۳۹۲). بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس باریجه در رویشگاه طبیعی شهرستان الیگودرز. اولین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار، همدان.

۷. زینلی، زینب؛ همتی، خدایار؛ مازندرانی، معصومه؛ اصغری، ژیل. (۱۳۹۲). اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، اتنوفارماکولوژی، فیتوشیمیایی و بررسی اثر باریجه در دو رویشگاه مختلف استان خراسان رضوی. اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۱(۴)، ۱۱-۲۲.
۸. اصغری، ژیل؛ گرگانلی دوجی، طاهر؛ قائمی، عزت‌الله. (۱۳۹۳). بررسی فیتوشیمیایی و ضدباکتریایی اسانس گیاه *Ferula gummosa* Boiss در منطقه میقان استان سمنان. اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، ۲(۱)، ۲۸-۳۵.
۹. کریمی ثانی، حمیدرضا؛ فردی، فرهادی؛ کوثری، زهرا. (۱۳۹۵). تعیین ترکیبات شیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی و خواص فلاونوئیدی گیاه باریجه از شهرستان سبزوار با استفاده از روش GC/MS. اولین کنگره بین‌المللی و بیست‌و‌چهارمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران، تهران.
۱۰. سروی، سحر؛ طاهرخانی، محبوبه؛ قربانی نهوجی، مجید. (۱۳۹۶). بررسی محتوای تام فلاونوئیدی عصاره گیاه *Ferula persica* var. *latisepta* Willd جمع‌آوری شده از ارتفاعات البرز مرکزی. چهارمین کنفرانس بین‌المللی نوآوری‌های اخیر در شیمی و مهندسی شیمی، تهران.
۱۱. ایزدی نیا، جعفر. (۱۳۹۸). تجزیه شیمیایی روغن اسانسی برگ و گل گیاه *Ferula persica* var. *persica* با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی گازی کوپل شده با طیف‌سنجی جرمی. مجله شیمی کوانتومی و اسپکتروسکوپی، ۹(۳۱)، ۵۵-۶۷.
۱۲. مجیدایی، الهام؛ حسینی طالعی، سیده‌راحله؛ غلام‌نژاد، سپیده؛ ابراهیم‌زاده، محمدعلی. (۱۳۹۹). مقایسه اهمیت روش‌های مختلف استخراج و نقش افزایش قطبیت حلال در محتوای تام فنل و فلاونوئیدی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کما. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۳۰(۱۸۸)، ۲۶-۳۹.

۱۳. Markham, A., & Goa, K. L. (۱۹۹۷). Valsartan: A review of its pharmacology and therapeutic use in essential hypertension. *Drugs*, ۵۴(۲), ۲۹۹-۳۱۱.
۱۴. Fernandez-Real, J. M., Lainez, B., & Vendrell, J. (۲۰۰۱). Shedding of TNF- α receptor, blood pressure, and insulin sensitivity in type ۲ diabetes mellitus. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, ۲۸۰(۶), E۹۵۲-E۹۵۹.
۱۵. Ludwig, E. H., Mahley, R. W., & Palaoglu, E. (۲۰۰۲). DGAT^۱ promoter polymorphism and blood pressure in a Turkish population. *Journal of Molecular Medicine*, ۸۰(۹), ۶۰۱-۶۰۵.
۱۶. Staessen, J. A., Kuznetsova, T., & Zhang, H. (۲۰۰۸). Blood pressure and renal function. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, ۱۷(۱), ۷۰-۷۶.