

بیولوژی: مبانی تا کاربرد

فصلنامه گروه بیولوژی دانشکده علوم پایه

سال اول/شماره ۱/ زمستان ۱۴۰۱

صاحب امتیاز: مؤسسه آموزش عالی آل طه

مدیرمسئول: دکتر فاطمه اکبریان

سردبیر: پروفسور محمود اکبریان

اعضای هیئت تحریریه: پروفسور محمود اکبریان، پروفسور سید سعید اشراقی، پروفسور سید علی حائری روحانی، پروفسور محمد حسین صنعتی، پروفسور قاسم آهنگری، دکتر علی قادری، دکتر فاطمه اکبریان، دکتر سمیه عرب زاده، دکتر سهامه محبی، دکتر فاطمه توحیدی.

دبیر تخصصی: دکتر فاطمه اکبریان، دکتر سمیه عرب زاده، دکتر فاطمه توحیدی، دکتر سهامه محبی.

مدیر داخلی: دکتر فاطمه توحیدی

ویراستار: محمد اسماعیل انصاری

تهران: تهران، شهران، بلوار کوهسار، بعد از آتش نشانی کن، خیابان مدرسه، مؤسسه آموزش عالی آل طه، دانشکده علوم پایه، دفتر مجلات.

تلفن: ۴۴۳۲۰۶۴۷ / کد پستی: ۱۴۸۸۸۳۶۱۶۴ / صندوق پستی: ۱۴۸۷۵-۳۳۳

چاپ و صحافی: چاپ دیجیتال المصطفی

- مجله از همکاری محققان و استادان استقبال می‌کند.
- مطالب مندرج در فصلنامه، مبین آرا و اندیشه‌های نویسندگان آنهاست.
- ارسال متن اصلی مقاله همراه با ترجمه چکیده، ضروری است.
- مجله در ویرایش ادبی مطالب دریافتی آزاد است.
- استفاده از مطالب مجله تنها با ذکر مأخذ مجاز است.

لطفاً به هنگام تنظیم مقالات موارد زیر رعایت شود:

- نام، نام خانوادگی، میزان تحصیلات، رتبه علمی نویسنده، شغل و شماره تلفن قید شود.
- فایل نهایی مقاله، به سامانه مجله ارسال شود.
- حجم هر مقاله بیش از ۲۵ صفحه حروف‌چینی شده ۳۰۰ کلمه‌ای نباشد.
- چکیده مقاله، حداکثر در ۲۵۰ کلمه باشد. چکیده آینه تمام‌نمای مقاله است که شامل بیان مسئله، هدف پژوهش، روش و اجمالی از یافته‌های مهم پژوهش می‌باشد.
- کلیدواژه‌ها فهرست موضوعی مقاله بوده بین ۵ تا ۷ واژه است.
- لازم است معادل انگلیسی چکیده و کلیدواژه‌ها نیز ارسال شود
- مقدمه مقاله، شامل تعریف مسئله، پیشینه اجمالی پژوهش، ضرورت و اهمیت طرح، جنبه نوآوری بحث، پرسش‌های اصلی و فرعی.
- سامان‌دهی بدنه اصلی مقاله، باید واجد یکی از شرایط زیر باشد:
- ارائه کننده نظریه و یافته جدید علمی؛ ارائه کننده تقریر و تبیین جدید از یک نظریه؛ ارائه‌کننده استدلال جدید برای یک نظریه؛ ارائه نقد جامع علمی یک نظریه.
- نتیجه‌گیری: بیانگر یافته‌های تفصیلی تحقیق که بصورت گزاره‌های خبری موجز بیان می‌گردد.
- واژگان کلیدی فارسی و معادل انگلیسی آنها درج شود.
- مقاله ارسالی نباید در هیچ نشریه داخلی یا خارجی چاپ شده باشد.
- مقاله ارسالی نباید هم‌زمان به سایر مجلات فرستاده شده باشد.
- درج معادل لاتین اسامی، و اصطلاحات مهجور، مقابل عبارت و در پرانتز ضروری است.
- منابع مورد استفاده، در متن به این شکل نوشته شود: نام خانوادگی نویسنده، تاریخ انتشار، شماره صفحه (مظفر، ۱۳۵۷، ص ۱۹۴) و فهرست منابع در آخر مقاله برحسب حروف الفبایی نام خانوادگی نویسنده، به شکل ذیل تنظیم گردد:
- الف) برای کتاب:** نام خانوادگی، نام؛ **عنوان کتاب؛** نام مترجم/ مصحح؛ شماره جلد، نوبت چاپ، محل نشر؛ ناشر، سال انتشار.
- ب) برای مقاله:** نام خانوادگی، نام؛ «عنوان مقاله»، **نام مجله؛** شماره مجله، سال انتشار.



فهرست

- ۵/ تشخیص و درمان سایتومگالوویروس انسانی بر مبنای تکنولوژی کریسپر/ فاطمه
عبدی وزوانی/ فاطمه اکبریان
- ۲۳/ القای آپوپتوز سلول‌های سرطان کولون توسط عصاره گیاه هندوانه ابوجهل/
فاطمه دارابی/ سمیه عربزاده/ حلیمه حسن‌پور/ آزاده حکمت
- ۳۵/ بررسی تأثیر و نحوه عملکرد توکسین‌های باکتریایی در درمان سرطان/ فاطمه
توحیدی/ فاطمه خرم شندی/ هانیه نجفی
- ۵۳/ کاربرد حسگرهای زیستی پلاسمونیک برای تشخیص انواع ویروس‌ها با تأکید
بر ویروس COVID-19/ سعیده زاغیان/ سهامه محبی/ زهرا امینی بیات/ ندا موسوی نیری
- ۷۹/ اثر تنش شوری و خشکی بر برخی صفات کمی و کیفی گیاه دارویی آلوئه ورا/
حسین زینلی/ معصومه حسن بارانی
- ۹۷/ استاندارد سازی مقادیر تانن‌های هیدرولیز شونده، ترکیبات پلی فنولیک و اثرات
آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی ژل گیاه *Aloe vera L.* در روش‌های مختلف/
علی قادری/ حسین صبوری فرد/ خدیجه احمدی/ امید عباس‌زاده/ امیر قربان‌زاده

CRISPR-Based Diagnosis and Treatment of Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection

* Fatemeh Abdi Vazvani

** Fatemeh Akbarian

Abstract

Human cytomegalovirus is the largest and most prevalent member of the human herpes virus family. The only natural host of this virus are human, with a worldwide outbreak. According to the health, economic, and social circumstances in various societies, 80 percent of adults typically have antibodies against the cytomegalovirus. This infection is asymptomatic and spreads in the environment by disseminating the virus from the infected person after the infection. As a result, there is a significant chance of infection and widespread diffusion of this virus. The purpose of this investigation is to utilize cutting-edge CRISPR genome editing technology to gather data on the life cycle, infectiousness, genetics, diagnosis, and therapy of this virus. Human cytomegalovirus, therapy, genome editing, and infectivity were used as keywords in the NCBI and PubMed databases to find the data for this study. These databases eventually yielded 80 articles, among which 42 were selected based on the criteria outlined in this article. The study of the preceding cases has demonstrated the effective use of the CRISPR tool with the Sherlock technique in the clinical diagnosis of this virus. Therefore, the use of this technology is

*MSc. Student, Genetics Group, Department of Basic Sciences, Ale-Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran.

**Assistant Professor, Genetics Group, Department of Basic Sciences, Ale-Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran (Corresponding Author).
E-mail: F.akbarian1@gmail.com

recommended to doctor and professionals for rapid and cost-effective diagnosis and treatment, being aware of its risks and challenges.

Keywords: Human Cytomegalovirus(HCMV), Treatment, Gene Editing, Diagnosis, Infectivity, CRISPR/Cas, SHERLOCK

تشخیص و درمان سایتومگالوویروس انسانی بر مبنای تکنولوژی کریسپر

*فاطمه عبدی وزوانی

**فاطمه اکبریان

چکیده

سایتومگالوویروس انسانی بزرگ‌ترین و شایع‌ترین عضو خانواده هرپس ویروس‌های انسانی محسوب می‌شود. این ویروس شیوع جهانی داشته و انسان تنها میزبان طبیعی آن می‌باشد. به طور کلی در ۸۰ درصد از بالغان آنتی‌بادی ضد ویروس سایتومگال وجود دارد که این بر حسب وضعیت بهداشتی، اقتصادی و اجتماعی در جوامع مختلف، متفاوت است. عفونت با سایتومگال بدون علامت است و بعد از آلودگی با دفع ویروس از شخص مبتلا، در محیط منتشر می‌شود؛ لذا این ویروس انتشار گسترده و احتمال عفونت‌زایی بالایی دارد. هدف از این مطالعه، گردآوری اطلاعاتی مبنی بر چرخه مولکولی عفونت‌زایی، ژنتیک ویروس، تشخیص و درمان این ویروس با استفاده از تکنولوژی نوین ویرایش ژنوم کریسپر می‌باشد. اطلاعات موجود در این مطالعه از پایگاه داده‌های NCBI و PubMed با استفاده از کلمات کلیدی ویروس سایتومگال انسانی، درمان، ویرایش ژنوم و عفونت‌زایی گردآوری شده است. در نتیجه ۸۰ مقاله توسط این پایگاه داده‌ها به دست آمد که ۴۲ مقاله با توجه به معیارهای مورد بحث در این نوشتار انتخاب شدند. مطالعه موارد ذکر شده بیانگر به‌کارگیری عظیم ابزار کریسپر با تکنیک شریک در تشخیص بالینی این ویروس بوده است؛ لذا استفاده از این تکنیک با در نظر گرفتن خطرات و چالش‌های آن به پزشکان و متخصصان جهت تشخیص و درمان سریع و کم‌هزینه پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: ویروس سایتومگال انسانی (HCMV)، درمان، عفونت‌زایی، ویرایش ژنوم، تشخیص، SHERLOCK, CRISPR/Cas.

* دانشجوی کارشناسی ارشد گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی آل طه، تهران، ایران.

** استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی آل طه، تهران، ایران (نویسنده مسئول).
f.akbarian1@gmail.com

مقدمه

سایتومگال انسانی یک ویروس DNA دار دورشته‌ای با ژنومی نزدیک به ۲۴۰ کیلوباز می‌باشد [۱]. با توجه به گزارش‌های مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها (CDC= Centers for Disease Control and Prevention) و سازمان بهداشت جهانی (WHO= World Health Organization)، ویروس سایتومگال انسانی می‌تواند افرادی را در هر رده سنی مبتلا کند. اگرچه عفونت CMV معمولاً بدون علامت است؛ اما می‌تواند منجر به پیامدهای شدیدی در افراد دارای نقص ایمنی، افراد دارای پیوند عضو و بیماران نیازمند به تزریق خون شود [۲، ۳].

CMV پس از عفونت اولیه می‌تواند در غدد بزاقی، کلیه‌ها، کبد و لنفوسیت‌ها جایگزین شده و منجر به ایجاد عفونت مزمن گردد. این ویروس می‌تواند از طریق ادرار، بزاق، منی، ترشحات گردن رحم و شیر دفع شود؛ اما به طور کلی بزاق و ادرار منابع اصلی انتشار ویروس می‌باشد. مهم‌ترین راه انتقال این ویروس، مسیرهای دهانی و تنفسی است؛ اما از طریق جفت، تزریق خون، پیوند اعضا و تماس جنسی هم امکان انتقال وجود دارد [۴]. عفونت با CMV در افراد طبیعی بالای ۷ سال و افراد بالغ باعث ایجاد سندرمی مشابه به منونوکلئوز (Mononucleosis) عفونی می‌گردد. در این بیماری اختلال‌های عملکرد کبد، تب، دردهای عضلانی و لنفوسیتوز با افزایش در تعداد لنفوسیت‌های آتیپیک (Atypic Lymphocytes) وجود دارد؛ اما از نظر وجود آنتی‌بادی-های هتروفیل منفی است که این مورد سبب افتراق این بیماری با منونوکلئوز ناشی از ویروس اپشتن بار (EBV) می‌گردد [۴].

از آنجایی که HCMV می‌تواند علائم مختلفی را نشان دهد، متخصصان برای تشخیص بموقع و درست این ویروس، با چالش‌های قابل توجهی مواجه‌اند [۵]. همچنین این ویروس نهفته پایدار، قادر به گریز از سیستم ایمنی بدن می‌باشد و لذا عفونت ناشی از آن به عنوان یک بحران بهداشتی در جمعیت‌های پرخطر محسوب می‌شود [۲].

(۱) شیوع ویروس سایتومگال انسانی

ویروس سایتومگال انسانی در جهان بسیار شایع است؛ به طوری که شیوع ۱۰۰ درصدی در آفریقا و آسیا و ۸۰ درصدی در اروپا و آمریکای شمالی گزارش شده است [۶]. سایتومگالوویروس قادر است افراد در هر رده سنی را مبتلا کند [۷]. در آمریکا بیش از ۵۰ درصد بزرگسالان در ۴۰ سالگی و تقریباً یک سوم کودکان در ۵ سالگی به ویروس سایتومگال آلوده می‌شوند [۷]. میزان مرگ و میر مشاهده‌شده در نوزادان مبتلا به این ویروس حدوداً ۳۰ درصد می‌باشد [۴]. عفونت با این ویروس در ۲ گروه افراد بسیار اهمیت دارد:

الف) نوزادان: از آنجا که HCMV طی بارداری قابلیت عبور از جفت را دارد، می‌تواند طی عود ویروس نهفته موجود در بدن مادر، از جفت عبور کرده و عفونت‌های شدیدی را در بدن جنین ایجاد کند. عفونت‌های مادرزادی ممکن است باعث مرگ جنین در داخل رحم شده یا ابتلا به بیماری اجسام سیتومگالیک نوزادان (CMID: Cytomegalic Inclusion disease of the newborn) تازه‌متولدشده را ایجاد کند. در این نوزادان سیستم اعصاب مرکزی و سیستم رتیکولاندوتیلیال به‌شدت درگیر شده و علائمی مانند خون‌ریزی، اختلالات بینایی، کاهش شنوایی، آسیب کبدی و میکروسفالی مشاهده می‌شود؛ همچنین بعضی نوزادان هنگام زایمان و عبور از کانال زایمان، دچار عفونت می‌شوند.

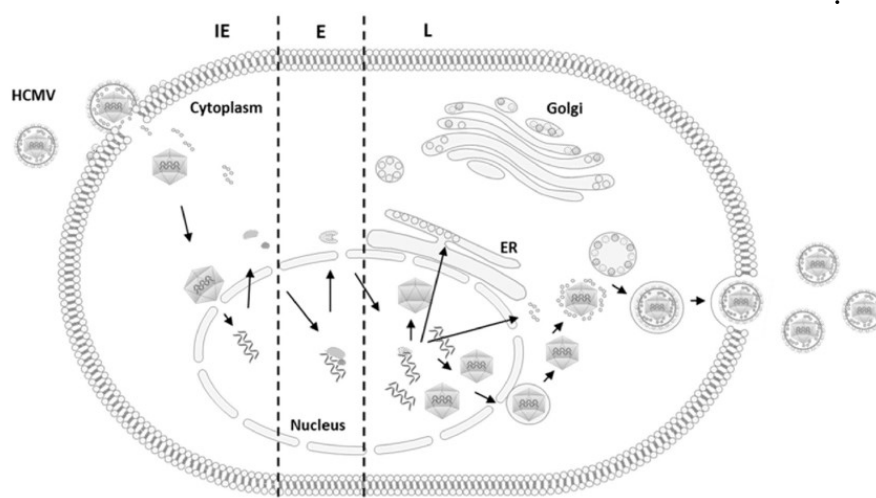
ب) بیماران مبتلا به نقص ایمنی: CMV در گیرندگان پیوند کلیه، قلب، ریه و کبد منجر به ایجاد عوارض و علائم متعددی می‌شود که از مهم‌ترین آن می‌توان به تب، لکوپنی، هپاتیت، گاستریت و کولیت اشاره کرد. شایع‌ترین عارضه در این بیماران پنومونی است [۴].

(۲) چرخه مولکولی عفونت‌زایی سایتومگال انسانی

مشکلات اجتماعی ناشی از سایتومگالوویروس، انگیزه‌ای را برای بررسی و مطالعه

چرخه زندگی و عفونت‌زایی پیچیده آن ایجاد می‌کند. ژنوم ویروس سایتومگال انسانی دارای ۱۹۲ قاب خوانش باز می‌باشد که توان بیان پروتئین‌های عملکردی را دارد و به عنوان بزرگ‌ترین ژنوم در میان دیگر ویروس‌های هرپس شناخته شده است [۸]. پتانسیل کدگذاری این ویروس گسترش بیشتری یافته و سطح بالایی از پیچیدگی ژنوم را نشان می‌دهد [۹]. تعاملات پویای ویروس و میزبان باعث تغییر عملکرد سلولی می‌شود و برای تکثیر و انتشار ویروس مورد نیاز است [۱۰]. گلیکوپروتئین‌های پوششی ویروسی که در قسمت خارجی ذره عفونی قرار دارند، در حین ورود با گیرنده‌های سلول میزبان تعامل می‌کنند تا از طریق ادغام با غشای سلول میزبان یا اندوسیتوز وارد سلول میزبان شوند. پروتئین‌های ویروسی به کپسید متصل شده و با میکروتوبول‌های میزبان برای انتقال کپسیدهای ویروسی به پوشش هسته و درون هسته تعامل می‌کنند [۱۱-۱۳]. در این زمان، سایر پروتئین‌های داخل سلول در سلول‌های آلوده به وسیله ذرات عفونی رسوب می‌کنند و مکان‌های مختلف داخل سلول را هدف می‌گیرند تا شروع پاسخ ایمنی را مهار و بیان ژن ویروسی را تنظیم کنند [۱۴-۱۶]. علاوه بر این بسیاری از پروتئین‌های کدگذاری‌شده با ویروس، مسیرهای سیگنال‌دهی و متابولیسم سلولی را تنظیم می‌کنند که باعث حمایت از همانندسازی ویروس و فرار از سیستم ایمنی می‌شود [۱۷، ۱۸]. بیان این پروتئین‌های ویروسی به صورت آبشاری بوده، به چند کلاس زمانی IE (Immediate Early)، DE (Delayed Early) و L (Late) تقسیم می‌شود که هر کدام جنبه‌های مختلف چرخه عفونی را تنظیم می‌کنند [۱۹، ۲۰]. کپسیدها در هسته جمع شده و خروج آنها از هسته از طریق اختلال در غشای دولایه هسته و لامین هسته‌ای است [۲۱، ۲۲]. هنگامی که کپسید به سیتوپلاسم می‌رسد، ادغام و انتقال ذرات ویروسی از طریق همکاری چند مسیر سلولی اتفاق می‌افتد [۲۳]. مسیر ترشحی سلول شامل شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی و اندوزوم‌ها، برای تشکیل یک مجموعه ویروسی سیتوپلاسمی پیچیده مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۴، ۲۵]. در این مجموعه، کپسید، لایه پوششی و پوشش ویروسی را از وزیکول‌های داخل سلولی به دست می‌

آورد. در مرحله بعد، ذرات عفونی تولیدشده به همراه سایر ذرات غیر عفونی، به نام اجسام متراکم، به فضای خارج سلولی فرستاده می‌شوند (شکل ۱). در سال‌های اخیر، مطالعات پروتئومی کمک قابل توجهی به درک زیست‌شناسی ویروس سایتومگال انسانی کرده است. ادغام رویکردهای پروتئومی با ویروس‌شناسی مولکولی، مطالعات میکروسکوپی و تکنیک‌های بیوشیمیایی توانسته است مراحل مختلف چرخه زندگی سایتومگالوویروس را در سطحی که قبلاً دست‌یافتنی نبود، توصیف کند [۲۶].



شکل ۱. چرخه مولکولی عفونت‌زایی ویروس سایتومگال انسانی. شکل فوق برگرفته از مقاله [۴۳] می‌باشد.

۳) تشخیص بر مبنای تکنولوژی کریسپر

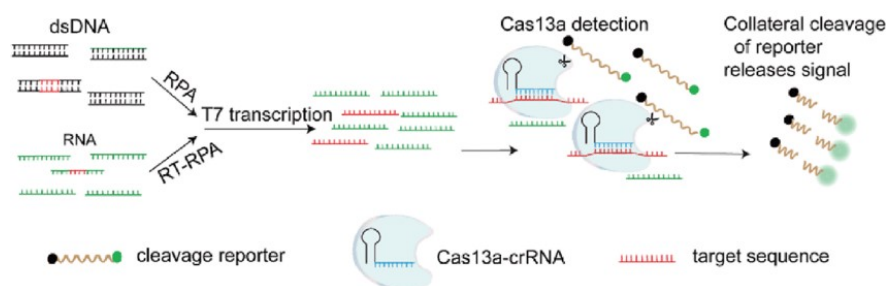
توالی‌های کوتاه پالیندرومی فاصله‌دار خوشه‌ای منظم (CRISPR= Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)، به عنوان بخشی از توالی‌های DNA در ژنوم پروکاریوت‌ها می‌توانند ایمنی اکتسابی را برای باکتری فراهم کنند. این توالی‌ها درواقع قسمتی از ژنوم ویروس‌های باکتریوفاژ بوده‌اند که باکتری آنها را در

ژنوم خود ذخیره کرده و در صورت برخورد مجدد با همان باکتریوفاژ، از این سیستم برای تشخیص مجدد باکتریوفاژ استفاده می‌کنند. در ادامه باکتری با رونویسی از این قطعه DNA خاص، یک توالی پالیندرومی از جنس RNA راهنما (gRNA: Guide RNA) ایجاد می‌کند که می‌تواند مکمل خود را در ژنوم باکتریوفاژ شناسایی کرده، به آن متصل شود. بخش دیگر این سیستم دفاعی، یک آنزیم برش‌دهنده DNA متصل به کریسپر به اسم Cas است که به gRNA کریسپر متصل می‌شود و پس از متصل شدن RNA به DNA ویروسی، آن را برش زده، باکتریوفاژ را غیر فعال می‌کند [۲۷]. نام‌گذاری اولیه ژن‌های Cas بر اساس مشابهت و فراوانی بالا صورت گرفته و به چهار دسته Cas1, Cas2, Cas3, Cas4 تقسیم شدند [۲۸]. در سال‌های اخیر، طبقه‌بندی سیستم‌های CRISPR/Cas پیشرفت و تغییرات چشمگیری داشته است؛ به طوری که طبقه‌بندی جدید در ۲ کلاس اصلی، ۶ گروه و ۴۸ زیرگروه تقسیم می‌شود [۲۹].

گسترده‌ترین حوزه مورد بررسی سیستم‌های تشخیصی کریسپر، تشخیص عفونت‌های ویروسی است. چندین محقق روش‌هایی را بر اساس خانواده‌های Cas13a و CRISPR/Cas12a توسعه داده‌اند که به ترتیب SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter un-Locking) و DETECTR (DNA Endonuclease-targeted CRISPR Trans Reporter) نامیده می‌شوند. روش DETECTR از آنزیم‌های گروه ۴ و زیرگروه Cas12a استفاده می‌کند و روش SHERLOCK از آنزیم‌های گروه ۵ و زیرگروه Cas13a استفاده می‌کند [۳۰-۳۲]. ویروس‌های DNA دار مثل هرپس ویروس‌ها شامل CMV و EBV با روش کریسپر شناسایی می‌شوند. در محیط بالینی شناسایی ویروس سایتومگال انسانی به وسیله تکنیک SHERLOCK صورت می‌گیرد [۳۳، ۳۴].

فناوری SHERLOCK و DETECTR روش بالقوه‌ای برای تشخیص و شناسایی سریع بیماری‌های عفونی با آزمایش‌های فوق حساس است که نیاز به پردازش و تجهیزات پیچیده ندارد. این تکنیک با این مکانیسم به تشخیص ویروس سایتومگال

انسانی می‌پردازد. واکنش SHERLOCK، از طریق پیش تقویت DNA (Preamplification) با یک ریکامیناز RPA یا پیش تقویت RNA (Recombinase Polymerase amplification) با رونویسی معکوس RPA (Reverse – transcriptase) و سپس تشخیص و فعال شدن آنزیم Cas13a انجام می‌شود. در طول پیش تکثیر، پروموتورهای T7 RNA پلیمراز اضافه می‌شوند تا امکان رونویسی از DNA تقویت شده به RNA را فراهم کند. سپس این RNA را می‌توان از طریق انکوباسیون با Cas13a، روابط مکملی RNA با کریسپر و حسگرهای RNA فلورسنت شناسایی کرد. با اتصال یک توالی RNA هدف، آنزیم Cas13a فعال شده و سایر گونه‌های RNA را در محلول از هم باز می‌کند. این پدیده به عنوان اثر برش جانبی (Collateral Cleavage) شناخته می‌شود. حسگرهای RNA با یک مولکول فلورسنت گزارشگر (Reporter) در انتهای ۵ پریم و یک مولکول خاموش کننده (Quencher) در انتهای ۳ پریم توسط Cas13a فعال شده و پس از شکافته شدن یک سیگنال فلورسنت ایجاد می‌شود [۳۵] (شکل ۲). در غیاب فعال سازی توسط Cas13، برش RNA گزارشگر، تولید فلورسنت و در نتیجه تشخیص عامل ویروسی امکان پذیر نیست [۳۵] (شکل ۲). فناوری کریسپر به دانشمندان اجازه می‌دهد با روشی مشابه، با تغییر RNA الگو و استفاده از یک پروتئین متصل به کریسپر موسوم به Cas، تغییراتی در DNA سلول مورد نظر اعمال کند [۲۷].



شکل ۲. مکانیسم تشخیص ویروس بر مبنای SHERLOCK، شکل برگرفته

از مقاله [۴۴] می‌باشد.

۴) درمان بر مبنای تکنولوژی کریسپر

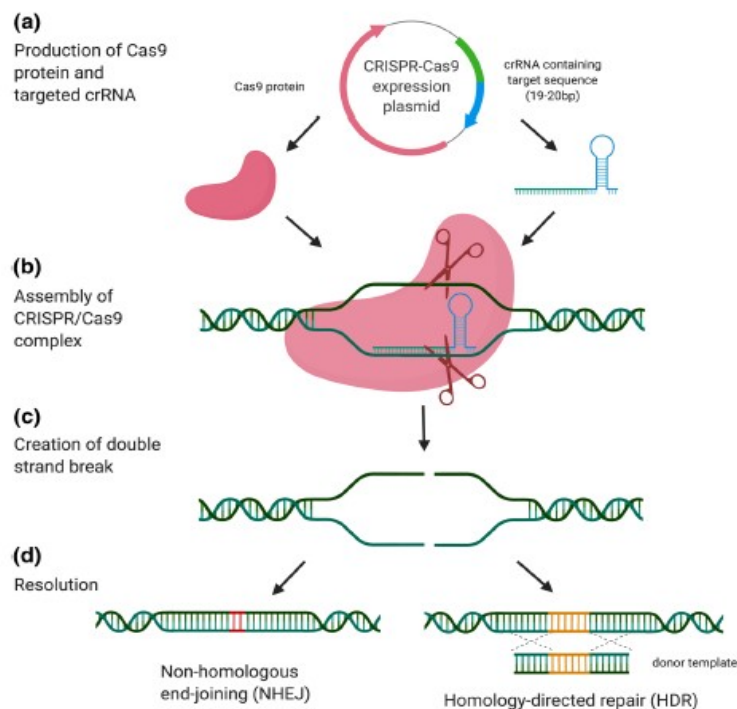
عفونت‌های ویروسی در ۳ حالت متمایز مشاهده می‌شوند:

۱. عفونت لیتیک: ویروس به طور فعال در حال تکثیر و تولید ویروس است و پس از بسته‌بندی ژنوم ویروسی در پوشش‌های پروتینی یا کپسیدها، از طریق لیز سلولی آزاد می‌شوند و در نتیجه سلول میزبان را از بین می‌برند [۳۶].
۲. عفونت نهفته: که در آن، ویروس وارد یک حالت خفته می‌شود که می‌تواند سال‌ها در آن باقی بماند. بسیاری از پاتوژن‌های مهم انسانی از جمله سائتومگالوویروس باعث عفونت نهفته می‌شوند [۳۷].
۳. عفونت مزمن: تکثیر مداوم ویروس در سطح پایین که منجر به آسیب مزمن اندام می‌شود [۳۸].

در عفونت ویروسی نهفته و مزمن، ژنوم ویروسی به طور نامحدود در داخل سلول میزبان نگهداری می‌شود یا در ژنوم میزبان ادغام می‌شود. هنگامی که ویروس در داخل سلول میزبان ساکن شد، درمان آن بسیار چالش‌برانگیز است [۳۹]. پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های ویرایش ژن به‌خصوص CRISPR/Cas9 امکان ایجاد تغییرات دقیق در طیف گسترده‌ای از ژنوم، از جمله ویروس‌های DNA دار فراهم کرده است [۴۰]. هدف روش کریسپر بر بیان مشترک یک نوکلئاز Cas9 پروکاریوتی و یک توالی RNA راهنما است. هنگامی که هدف‌گیری gRNA توسط Cas9 دچار شکست ۲ رشته‌ای (DBS= Double-Stranded Break) می‌شود، دو فرایند اصلی ترمیم آسیب با هم رقابت کرده و باعث تغییراتی در توالی اصلی می‌شوند. اتصال انتهای غیرهمولوگ (NHEJ= Non-homologous end-joining) یک فرایند مستعد خطاست که در آن جفت بازها اغلب قبل از اینکه دو انتها به هم متصل شوند، به دنباله آسیب‌دیده اضافه یا کم می‌شوند و به طور قابل توجهی باعث جهش‌های (INDEL= Insertion and deletion) می‌شوند. نو ترکیبی همولوگ (HR= Homologous Recombination) نیز توالی را با استفاده از بخش‌هایی از DNA همولوگ به عنوان الگو ترمیم می‌کند که وقتی با ساختار DNA

اگزوزن جفت می‌شود، امکان ایجاد تغییرات دقیق در ژنوم هدف را فراهم می‌کند [۴۱] (شکل ۳).

در ادامه به بررسی کارایی و امکان‌سنجی استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر کریسپر برای مهندسی ژنوم HCMV می‌پردازیم. روش‌های مبتنی بر کریسپر برای هدف‌گیری موثر توالی‌های ژن سایتومگالوویروس از طریق جهش INDEL و نوترکیبی همولوگ استفاده می‌شوند. پس از ارزیابی پارامترهای تجربی مختلف، متوجه شدیم که جهش‌های INDEL با واسطه NHEJ می‌توانند منجر به حذف بیش از ۷۵ درصد ژن شوند؛ در حالی که جهش‌های هدف‌گیری‌شده توسط HR می‌توانند به نوترکیبی بیش از ۴۰ درصد برسند. درمجموع این نتایج زمینه را برای استفاده از کریسپر در فیروپلاست‌های اولیه جهت ایجاد تغییرات خاص در ژنوم سیتومگالوویروس، ساده‌سازی تولید ویریون‌های جهش یافته و تسهیل بررسی فرایندهای مهم برای تکثیر HCMV فراهم می‌کند [۴۲]. با این حال، سیستم‌های مبتنی بر کریسپر می‌توانند برای هدف‌قراردادن ژنوم‌های ویروسی در داخل سلول میزبان مورد استفاده قرار گرفته و آنها را برای رونویسی و تکثیر دچار مشکل کند. بنابراین ویرایش ژن می‌تواند پتانسیل درمانی برای عفونت‌های چالش‌برانگیز ارائه دهد [۳۹].



شکل ۳. مکانیسم عملکرد تکنولوژی کریسپر در ژن‌درمانی. شکل برگرفته از مقاله

[۳۹] می‌باشد.

نتیجه‌گیری

تکنولوژی کریسپر به عنوان یک کشف برجسته و نوظهور در زمینه مهندسی ژنتیک پدیدار شده و تأثیر عمده‌ای در بسیاری از زمینه‌های پزشکی بالینی دارد. به علاوه این تکنیک دقت و کیفیتی مشابه روش‌های پیشین در تشخیص بیماری‌های عفونی دارد و ارزان‌تر از تکنیک‌های پیشین است. در این مقاله ما مواردی را در خصوص ویروس سایتومگال انسانی از جمله شیوع، چرخه مولکولی عفونت‌زایی، استفاده از کریسپر در تشخیص سریع و کم‌هزینه و همچنین درمان این ویروس با این روش بررسی کردیم. با این حال چالش‌های مالی و مدیریتی قابل توجهی در استفاده از روش‌های ژن‌درمانی به خصوص ویرایش ژن از طریق تکنولوژی کریسپر وجود دارد که باید قبل از استفاده از

آن در مقیاس‌های بزرگ و جهانی مورد توجه قرار گیرد. پیشرفت چشمگیر تکنولوژی در دهه‌های اخیر و درک بهتر از دوام و ایمنی ویرایش ژن، ممکن است در آینده منجر به شناخت بهتری از روش‌های ایمن‌تر و با کارایی بالاتر در درمان بیماری‌های ژنتیکی، عفونت‌های ویروسی مزمن، انواع سرطان‌ها و بیماری‌های خونی گردد. تشخیص و درمان‌های مبتنی بر کریسپر احتمالاً در آینده نزدیک در موارد بالینی مورد استفاده قرار خواهند گرفت و پزشکان باید از پتانسیل فوق‌العاده این روش و خطرات بالقوه آن آگاه باشند.

References

1. Nikolich-Zugich, J. and R. A. van Lier; "Cytomegalovirus (CMV) research in immune senescence comes of age: overview of the 6th International Workshop on CMV and Immunosenescence", **Geroscience**; 39(3), 2017, pp.245-249.
2. Al Mana, H., et al.; "The current status of cytomegalovirus (CMV) prevalence in the MENA region: A systematic review", **Pathogens**; 8(4), 2019, p.213.
3. Sylwester, A. W., et al.; "Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects", **The Journal of experimental medicine**; 202(5), 2005, pp.673-685.
4. Lancini, D., et al., "Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults", **Medical Journal of Australia**; 201(10), 2014, pp.578-580.
5. Cannon, M. J., D. S. Schmid, and T. B. Hyde; "Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection", **Reviews in medical virology**; 20(4), 2010, pp.202-213.
6. Control, C. f. D. and Prevention; Cytomegalovirus (CMV) and congenital CMV infection. Testing and diagnosis of CMV infection [<http://www.cdc.gov/cmV/testing-diagnosis.html>], 2016.
7. Murphy, E., et al., "Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential", **Proceedings of the National Academy of Sciences**; 100(23), 2003, pp.13585-13590.
8. Stern-Ginossar, N., et al., "Decoding human cytomegalovirus", **Science**; 338(6110), 2012, pp.1088-1093.
9. Isaacson, M., L. Juckem, and T. Compton; "Virus entry and innate immune activation", **Human Cytomegalovirus**; 2008, pp.85-100.
10. Gibson, W.; "Structure and formation of the cytomegalovirus virion", **Human cytomegalovirus**; 2008, pp.187-204.
11. Kalejta, R.; "Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression", **Human cytomegalovirus**; 2008, pp.101-115.
12. Ogawa-Goto, K., et al.; "Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid", **Journal of virology**; 77(15), 2003, pp.8541-8547.

13. Cristea, I. M., et al.; "Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein", **Journal of virology**; 84(15), 2010, pp.7803-7814.
14. Hwang, J. and R. F. Kalejta; Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells", **Virology**; 367(2), 2007, pp.334-338.
15. Li, T., J. Chen, and I. M. Cristea; "Human cytomegalovirus tegument protein pUL83 inhibits IFI16-mediated DNA sensing for immune evasion", **Cell host & microbe**; 14(5), 2013, pp.591-599.
16. Yu, Y., A. J. Clippinger, and J. C. Alwine; "Viral effects on metabolism: changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection", **Trends in microbiology**; 19(7), 2011, pp.360-367.
17. Yurochko, A., "Human cytomegalovirus modulation of signal transduction", **Human Cytomegalovirus**; 2008, pp.205-220.
18. Chambers, J., et al.; DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression", **Journal of virology**; 73(7), 1999, pp.5757-5766.
19. Mocarski, E., et al.; Cytomegaloviruses In: Knipe DM, Howley PM, editors; **Fields virology**; 6th ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, pp.1960-2014.
20. Buchkovich, N. J., T. G. Maguire, and J. C. Alwine; "Role of the endoplasmic reticulum chaperone BiP, SUN domain proteins, and dynein in altering nuclear morphology during human cytomegalovirus infection", **Journal of virology**; 84(14), 2010, pp.7005-7017.
21. Hamirally, S., et al.; "Viral mimicry of Cdc2/cyclin-dependent kinase 1 mediates disruption of nuclear lamina during human cytomegalovirus nuclear egress", **PLoS pathogens**; 5(1), 2009, pp.e1000275.
22. Moorman, N. J., et al.; "A targeted spatial-temporal proteomics approach implicates multiple cellular trafficking pathways in human cytomegalovirus virion maturation", **Molecular & Cellular Proteomics**; 9(5), 2010, pp.851-860.

23. Das, S. and P. E. Pellett; "Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in human cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells", **Journal of virology**; 85(12), 2011, pp.5864-5879.
24. Das, S., A. Vasanji, and P. E. Pellett; "Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus", **Journal of virology**; 81(21), 2007, pp.11861-11869.
25. Beltran, P. M. J. and I. M. Cristea; "The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics", **Expert review of proteomics**; 11(6), 2014, p.697.
26. Filip, L.; "Genetic enhancement, TED talks and the sense of wonder", **Medical Humanities**; 47(2), 2021, pp.210-218.
27. Jansen, R., et al.; Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes", **Molecular microbiology**; 43(6), 2002, pp.1565-1575.
28. Makarova, K. S., et al.; "Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants", **Nature Reviews Microbiology**; 18(2), 2020, pp.67-83.
29. Bhattacharyya, R. P., S. G. Thakku, and D. T. Hung; "Harnessing CRISPR effectors for infectious disease diagnostics", **ACS Infectious Diseases**; 4(9), 2018, pp.1278-1282.
30. Katalani, C., et al.; "CRISPR-based diagnosis of infectious and noninfectious diseases", **Biological procedures online**; 22(1), 2020, pp.1-14.
31. Kocak, D. D. and C. A. Gersbach; **From CRISPR scissors to virus sensors**; Nature Publishing Group, 2018.
32. Hsu, J. L. and S. L. Glaser; "Epstein–Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications", **Critical reviews in oncology/hematology**; 34(1), 2000, pp.27-53.
33. Kruse, E., et al.; "CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Herpesviruses Limits Productive and Latent Infections", **PLoS pathogens**; 12(6), 2016, pp.e1005701-e1005701.
34. Caliendo, A. M. and R. L. Hodinka; "A CRISPR Way to Diagnose Infectious Diseases", **New England Journal of Medicine**; 377(17), 2017, pp.1685-1687.
35. Traylen, C. M., et al.; "Virus reactivation: a panoramic view in human infections", **Future virology**; 6(4), 2011, pp.451-463.

-
36. Lieberman, P. M., "Epigenetics and genetics of viral latency", **Cell host & microbe**; 19(5), 2016, pp.619-628.
 37. Virgin, H. W., E. J. Wherry, and R. Ahmed; "Redefining chronic viral infection", **Cell**; 138(1), 2009, pp.30-50.
 38. Binnie, A., et al.; "CRISPR-based strategies in infectious disease diagnosis and therapy", **Infection**; 49(3), 2021, pp.377-385.
 39. Lin, C., et al.; "Increasing the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing of HSV-1 virus in human cells", **Scientific reports**; 6(1), 2016, pp.1-13.
 40. Ran, F., et al.; "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system", **Nature protocols**; 8(11), 2013, pp.2281-2308.
 41. King, M. W. and J. Munger; "Editing the human cytomegalovirus genome with the CRISPR/Cas9 system", **Virology**; 529, 2019, pp.186-194.
 42. Yin, L., et al.; "CRISPR-Cas based virus detection: Recent advances and perspectives", **Biosensors and Bioelectronics**; 193, 2021, pp.113541.
 43. Manandhar, T., et al.; "Battle between host immune cellular responses and HCMV immune evasion", **International Journal of Molecular Sciences**; 20(15): 2019, p.3626.

Apoptosis Induction of Colon Cancer Cells by Citrullus Colocynthis Extract

*Fatemeh Darabi

** Somayeh Arabzadeh

*** Halimeh Hassanpour

**** Azadeh Hekmat

Abstract

Introduction: In this study the effect of *C. colocynthis* extract on the growth of colon cancer cells, and the expression of Caspase 3 and Bax were investigated. **Materials & Methods:** colon cancer cells (HT29) were treated with different concentrations of *C. colocynthis* extracts for 24, 48 & 72 hours. The percentage of cell survival was then measured by MTT assay. Expression of Caspase 3 and Bax genes was investigated by real-time PCR. At the end results were analyzed by SPSS software. **Results:**

Treatment of cells with citrus extract showed that at low concentrations (1 and 2 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) there was a significant difference in the rate of cell death between treatment times (24, 48 and 72 hours) ($P < 0.05$). However, at higher concentrations, no significant difference was observed in the rate of cell. The expression of Bax gene was significantly increased by treatment of *C. colocynthis*

**Assistant Professor of Basic science, Department of Biology of Ale Taha Institute of Higher Education.

**Assistant Professor of Basic science, Department of Biology of Ale Taha Institute of Higher Education.

***Science Ministry of Research and Technology, Aerospace Research Institute.

**** Faculty of Basic science, Department of Biology of Islamic Azad University, Science and Research Branch.

extract (1.67-fold) ($p < 0.01$).

In addition, the Abujahl watermelon extract significantly increased the expression of caspase 3 gene (1.75) ($p < 0.01$). Conclusion: The anticancer effect of Citrullus Colocynthis extract can be applied by increase the expression of Bax and caspase 3 genes and as a result, apoptosis induction in cancer cells.

Keywords: Citrullus Colocynthis Extract (Abujahl Watermelon), Bax, Caspase 3, Colon Cancer.

القای آپوتوز سلول‌های سرطان کولون توسط عصاره گیاه هندوانه ابوجهل

*فاطمه دارابی

**سمیه عرب‌زاده

***حلیمه حسن‌پور

****آزاده حکمت

چکیده

در این مطالعه اثر عصاره هندوانه ابوجهل (*Citrullus Colocynthis*) بر تکثیر سلول‌های سرطان کولون بررسی شد. سپس میزان بیان فاکتورهای آپتوزی شامل کاسپاز ۳ و Bax ارزیابی گردید. سلول‌های سرطان کولون انسانی (۲۹HT) با غلظت‌های مختلف ۲ تا ۳۰ (میکروگرم/میکرولیتر) عصاره سیتروولوس به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. سپس درصد بقای سلول‌ها با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد. در نهایت بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و Bax با روش real-time PCR بررسی گردید. در نهایت نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS آنالیز شد. تیمار سلول‌ها با عصاره سیتروولوس نشان داد در غلظت‌های پایین (۱ و ۲ میکروگرم/میکرولیتر) تفاوت معناداری در میزان مرگ سلول‌ها در بین مدت زمان تیمار (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) وجود دارد ($P < 0.05$). این در حالی است که در غلظت‌های بالاتر تفاوت معناداری در میزان مرگ سلول‌ها در بین مدت زمان تیمار مشاهده نشد. ترکیب عصاره سیتروولوس سبب افزایش معنادار 1.67 برابری بیان ژن Bax شد ($P < 0.01$). به علاوه عصاره سیتروولوس به طور معناداری بیان ژن کاسپاز ۳ را افزایش داد ($P < 0.01$). اثرات ضد سرطانی عصاره سیتروولوس با افزایش بیان ژن‌های Bax و کاسپاز ۳ و در نتیجه القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در سلول‌های سرطان کولون اعمال می‌شود.

واژگان کلیدی: عصاره هندوانه ابوجهل (سیتروولوس)، Bax، کاسپاز ۳، سرطان کولون.

* گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی غیر انتفاعی آل طه (نویسنده

مسئول).
s.arabzadeh@aletaha.ac.ir

*** پژوهشگاه هوا فضا، وزارت علوم و تحقیقات، تهران ۸۳۴-۱۴۶۶۵، ایران.

**** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

مقدمه

بیشتر سرطان‌های کولورکتال از تومورهای کوچک غیر خوش‌خیم و از سلول‌هایی به نام پولیپ‌های آدنوماتوز آغاز می‌شوند. با گذشت زمان برخی از این پولیپ‌ها می‌توانند به سرطان کولون تبدیل شوند. پولیپ‌ها ممکن است کوچک باشند و علائم کمتری داشته باشند. پولیپ به یک برجستگی قابل رؤیت از سطح مخاطی اطلاق می‌شود که از نظر آسیب‌شناختی می‌تواند به صورت هامارتوم غیر نئوپلاستیک، تکثیر مخاطی هیپرپلاستیک یا پولیپ آدنوماتوز رده‌بندی شود. تنها آدنوم‌ها ضایعات پیش بدخیم بوده و قسمتی از این ضایعات به سرطان تبدیل می‌شوند [۱]. بررسی اطلاعات همه‌گیرشناسی نشان داده است شیوع سرطان کولون در مردان بیشتر از زنان می‌باشد. وقوع سرطان کولورکتال در مناطق مختلف جهان نیز بسیار متفاوت می‌باشد [۲،۳]. بر اساس مطالعاتی از ایران در سال ۲۰۰۲، سالیانه بیش از ۵۰۰۰۰ مورد سرطان جدید در ایران بروز می‌کند که ۳۸٪ آن مربوط به دستگاه گوارش است [۲]. بر همین اساس و مطالعات انجام‌شده، بروز سرطان کولورکتال در ایران رتبه سوم در مردان و رتبه چهارم در زنان را به خود اختصاص داده است [۳]. درمان سرطان کولورکتال معمولاً بستگی به محل تومور در کولون یا رکتوم و همچنین مرحله بیماری دارد. درمان‌های رایج سرطان کولورکتال شامل جراحی، شیمی‌درمانی، درمان بیولوژیک یا پرتودرمانی می‌باشد. هر چند برخی از بیماران ترکیبی از این درمان‌ها را دارند [۴]. جراحی رایج‌ترین درمان مورد استفاده برای سرطان کولورکتال محسوب می‌گردد [۵]. القای آپوپتوز می‌تواند یکی از مکانیسم‌های مهم در مهار تکثیر سلول‌های سرطانی باشد. عامل‌های متعددی در کنترل و تنظیم آپوپتوز دخیل‌اند که در این میان سیتوکروم C، کاسپاز ۳ و پروتئین Bax از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند [۶].

کاسپازها جزء خانواده‌ای از آنزیم‌های پروتئازی سیستئین-آسپارتات هستند که با توجه به نقش آنها در تجزیه پروتئین‌ها نقش بسیار محوری در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی دارند. کاسپازها بر اساس عملکردشان به دو نوع آغازگر شامل کاسپازهای ۸، ۹

و ۱۰ و نوع اجرایی شامل کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ و مسیر داخلی شامل کاسپاز ۹ می باشند که هر دو مسیر همگرا بوده و از کاسپازهای اجرایی استفاده می نمایند که به طور آبشاری فعال شده و منجر به انهدام سلول ها می شود [۶]. در میان انواعی از کاسپازها نظیر کاسپاز ۱، ۳، ۴ و ۹، کاسپاز نوع ۳ نقشی بسیار کلیدی و محوری در مرگ برنامه ریزی شده سلولی دارد. این کاسپاز توسط فعالیت کاسپاز ۹ فعال شده و سپس با تجزیه و تخریب اندامک های داخل سلولی منجر به مرگ سلولی می شود. در کنار کاسپازها، پروتئین های خانواده «B-cell lymphoma-2» (Bcl_2) که ابتدا به عنوان پروتوانکوژن در لنفومای فولیکولار سلول های B شناسایی شدند، نقش محوری در تنظیم آپوپتوز دارند. «Bcl₂-associated X protein» (Bax) از اعضای پروآپوپتوز خانواده Bcl₂ می باشد. افزایش بیان این پروتئین منجر به افزایش روند آزادسازی سیتوکروم C و در نهایت فعال شدن کاسپاز ۹ توسط سیتوکروم C می گردد. بنابراین افزایش بیان کاسپازها و همچنین پروتئین Bax در القای مرگ سلول های سرطانی نقش کلیدی خواهند داشت [۶]. هدف از این پژوهش بررسی اثر ضد سرطانی عصاره گیاه سیترولوس کولوسینتوس (*Citrullus Colocynthis*) بر بیان ژن های Bax و Caspase3 در دودمان سلولی سرطان کولون (Ht29) می باشد.

۱. مواد و روش ها

۱-۱. تهیه غلظت های مختلف از محلول عصاره سیترولوس

ترکیب عصاره گیاهی سیترولوس از شرکت باریج اسانس (کاشان) خریداری شدند. غلظت های مختلفی از عصاره گیاهی (۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر) در آب دیونیزه ساخته و در یخچال نگهداری گردید.

تیمار سلول های HT29 با غلظت های مختلف عصاره سیترولوس و فیکوسیانین

دودمان سلولی سرطان کولون انسان (HT29) (خریداری شده از انیستیتو پاستور ایران) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. سلول ها در محیط کشت استاندارد

(DMEM)، همراه با ۱۰٪ سرم غیر فعال جنین گاو (FBS)، پنی سیلین (100 unit/ml) و استرپتومایسین (10µg/ml) و در شرایط استاندارد کشت داده شدند. تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم/میکرولیترا از عصاره انجام شد. میزان مرگ سلولی پس از گذشت زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، به روش MTT بررسی شد تا بهترین غلظت تأثیرگذار و با سمیت کمتر برای مطالعات بعدی به دست آید.

۲-۱. بررسی اثر سمیت عصاره‌ها بر سلول‌های سرطانی

اثرات سمیت عصاره‌های گیاهی بر سلول‌های توموری با استفاده از روش MTT [3- 2, 5- diphynyltetrazolium bromide - (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)] بررسی گردید. سوسپانسیون سلولی (به تعداد تقریبی $10^4 \times 1$ سلول) به داخل یک پلیت ۹۶ چاهکی انتقال داده شدند. پس از آن سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره سیترولوس (۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) تیمار شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی شد. سنجش در سه تکرار برای هر یک از غلظت‌ها انجام شد. ابتدا محیط رویی از چاهک خارج و ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. ۱۲۵ میلی‌لیتر DMSO برای حل شدن بلورهای MTT به چاهک اضافه شد. پلیت‌ها برای ۱۵ دقیقه روی صفحه لرزان قرار گرفته و جذب در طول موج 570 نانومتر با دستگاه اسپکترومتر خوانده شد. درنهایت میانگین زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با عصاره نسبت به گروه کنترل (سلول‌های تیمار نشده) مقایسه شد.

۲. استخراج RNA کل از سلول‌های سرطانی

استخراج RNA از سوسپانسیون سلولی با استفاده از کیت RNX-Plus (SinaClon; RN7713C) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده کیت مورد نظر انجام شد. تأیید کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از روش‌های نانودراپ و الکتروفورز روی ژل

آگارز انجام گردید؛ سپس cDNA از روی RNA طبق پروتکل استاندارد ساخته شد.

۳. روش Real time PCR

پرایمرهای مورد استفاده برای تکنیک Real time PCR شامل Bax و Caspase3 به همراه ژن کنترل داخلی GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) از شرکت سیناکولون خریداری شد (جدول ۱). پس از ۴۰ چرخه میزان mRNAs بیان شده برای هر ژن در مقایسه با میزان بیان mRNAs ژن کنترل GAPDH با استفاده از فرمول $[\Delta CT = CT(target) - CT(control)]$ محاسبه شد؛ همچنین بیان ژن با روش $2^{-\Delta Ct}$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱. مشخصات توالی پرایمرهای مربوط به هر یک از ژن ها

Gene	Forward	Reverse
Bax	TCCCCCGAGAGGTCT TTT	CGGCCCCAGTTGAAGT TG
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGG AGTC	GAAGATGGTGATGGGA TTTC
Caspase 3	GCCTGCCGTGGTACA GAACTGG	GCATACAAGAAGTCGG CCTCCAC

۴. آنالیز آماری

از آزمون شاپیروویلک برای تعیین نرمال بودن توزیع داده ها و از آزمون لوین جهت بررسی تجانس واریانس ها استفاده شد؛ همچنین توصیف کمی داده ها بر اساس شاخص های پراکندگی مرکزی شامل میانگین و انحراف استاندارد برای اطلاعات به دست آمده از Real time PCR انجام شد. از آنالیز واریانس یک طرفه به منظور بررسی تغییرات معناداری هر یک از متغیرهای مورد مطالعه، بین گروه های مختلف، استفاده شد. به هنگام وجود تفاوت معنادار آماری، آزمون تعقیبی توکی در برنامه ANOVA جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی به کار برده شد. از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ برای تمامی آنالیزهای آماری در این مطالعه استفاده شد؛ همچنین سطح معناداری برای تمام محاسبات $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

۵. نتایج

۵-۱. اثر عصاره سیتروولوس بر مهار رشد سلول‌های سرطان کولون انسانی

بر اساس نتایج آزمایش MTT با غلظت‌های متفاوت از عصاره، میزان IC50 عصاره سیتروولوس پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار به ترتیب 22.14 ± 1.18 ، 19.23 ± 1.12 ، 20.08 ± 0.5 (میکروگرم/میکرولیتر) اندازه‌گیری شد. بین غلظت تیمارها و میزان مهار رشد سلول‌های سرطانی ارتباطی مستقیم مشاهده شد؛ به طوری که کمترین اثرپذیری در غلظت ۱ (میکروگرم/میکرولیتر) و بیشترین اثرپذیری در غلظت ۵۰ (میکروگرم/میکرولیتر) در هر سه زمان تیمار مشاهده گردید (جدول ۱).

تیمار سلول‌ها با عصاره سیتروولوس نشان داد در غلظت‌های پایین (۱ و ۲ میکروگرم/میکرولیتر) تفاوت معناداری در میزان مرگ سلول‌ها در بین مدت زمان تیمار (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) وجود دارد ($P < 0.05$). این در حالی است که در غلظت‌های بالاتر تفاوت معناداری در میزان مرگ سلول‌ها در بین مدت زمان تیمار مشاهده نشد. با بالا رفتن غلظت عصاره، اثر زمان کاهش می‌یابد و ما اثرات مرگ سلولی را در ۲۴ ساعت پس از تیمار مانند ۴۸ و ۷۲ ساعت خواهیم دید؛ در حالی که در غلظت‌های پایین‌تر نقش مدت زمان تیمار بر القای مرگ سلولی پررنگ‌تر از غلظت عصاره می‌باشد (شکل ۱).

۵-۲. اثر عصاره سیتروولوس بر بیان ژن Bax و Caspase3

آزمایش‌های بررسی بیان ژن توسط تکنیک Real time-PCR نشان داد عصاره سیتروولوس منجر به افزایش معنی‌دار $2/35$ برابری در بیان ژن Bax در سلول‌های سرطانی نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0.01$) (شکل ۲)؛ همچنین میزان بیان ژن کاسپاز ۳ تحت تیمار با عصاره سیتروولوس 1.75 برابر نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($p < 0.05$) (شکل ۳).

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، عصاره سیتروولوس در هر سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، اثراتی مبنی بر کاهش رشد سلول‌ها را بر دودمان سلولی سرطان

کولون نشان داد. با افزایش غلظت تیمار میزان تأثیرپذیری آنها بر مهار رشد سلول های سرطانی در هر سه بازه زمانی افزایش یافت؛ به طوری که در غلظت ۱ میکروگرم/میکرولیتر کمترین اثرپذیری و در غلظت ۵۰ میکروگرم/میکرولیتر بیشترین اثرپذیری مشاهده گردید. بنابراین با توجه به نتایج حاصله، تیمار در غلظت های بالاتر اثر بیشتری در مرگ سلولی داشت.

نتایج پژوهش ما بر بیان ژن های Bax و کاسپاز ۳ نشان داد عصاره سیتروولوس به طور معناداری سبب افزایش بیان این ژن ها گردید. از آنجایی که پروتئین Bax و کاسپاز ۳ نقش کلیدی در القای فرایند آپوپتوز دارند، نتایج حاصل از پژوهش ما نشان داد عصاره سیتروولوس با افزایش بیان ژن های Bax و کاسپاز ۳ سبب القای آپوپتوز در سلول های سرطانی کولون می شوند. به نظر می رسد افزایش بیان Bax و کاسپاز ۳ یکی از مکانیسم های عملکرد عصاره سیتروولوس می باشد؛ هرچند این موضوع نیازمند مطالعات بیشتر در سطح پروتئین می باشد.

در همین راستا با مطالعات متعددی تأثیر عصاره هندوانه ابوجهل در القای آپوپتوز و مهار رشد و تکثیر انواعی از دودمان های سلول های سرطانی بررسی گردیدند. در پژوهش Tavakol و همکارانش، تأثیر عصاره هندوانه ابوجهل در مهار رشد سلولی سرطان حنجره و همچنین فیبروبلاست نرمال موشی L-929 نشان داده شد. این اثرات سیتوتوکسیک وابسته به غلظت بوده است و قادر است فرایند مرگ سلولی یا آپوپتوز را القا کند [۷]. در مطالعه Liu، عصاره هندوانه ابوجهل با القای آپوپتوز و ممانعت از چرخه سلولی اثر ضد سرطانی بر سلول های هیپای ۲ داشت [۸]. در مطالعه دیگری Lan و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند کوکوروبیتاسین E، رشد سلول های سرطانی پستان انسانی را با در نظر گرفتن غلظت و زمان باز می دارد. آنالیزهای بعدی آنها نشان داد کوکوروبیتاسین E سبب توقف فاز G2/M و القای آپوپتوز سلولی می گردد. همچنین آنها نشان دادند کوکوروبیتاسین E سبب القای بیان کاسپاز ۳ و تنظیم مثبت P21

و P27 می‌گردد [۹]. نتایج این پژوهش تا حدود زیادی همسو با یافته‌های پژوهش ما بوده است. در مطالعه ما عصاره هندوانه ابوجهل با افزایش بیان پروتئین Bax و کاسپاز ۳ سبب افزایش مرگ سلول‌های سرطان کولون شد؛ همچنین در مطالعه دیگری تأثیر عصاره هیدروالکلی هندوانه ابوجهل بر بیان ژن کاسپازها، به‌ویژه کاسپاز ۳ و ۸، در دودمان سلولی سرطان پستان MCF-7 نشان داده شده است. تیمار سلول‌های سرطانی با افزایش بیان ژن‌های مربوط به کاسپازها و نهایتاً القای آپوپتوز همراه بود. همچنین با افزایش غلظت و زمان کشت در حضور این عصاره، درصد سلول‌های سرطانی زنده به طور چشمگیری کاهش یافت [۱۰].

فعالیت ضد سرطانی عصاره میوه هندوانه ابوجهل بر دودمان‌های سلولی سرطان پستان و آدنوکارسینومای معده نیز بررسی شده است؛ به طوری که این عصاره دارای اثر مهارکنندگی بالایی علیه سلول‌های سرطانی پستان و آدنوکارسینومای معده می‌باشد. این اثر مهار از راه مسیر وابسته به القای کاسپازها، سیتوکروم C و Bcl2/Bax منجر به القای آپوپتوز در آنها شده است [۱۱].

در ادامه مطالعات صورت‌گرفته، نتایج این مطالعه اثرات عصاره سیترولوس را بر افزایش بیان ژن‌های Bax و کاسپاز ۳ و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون انسانی گزارش کرد. هرچند به نظر می‌رسد افزایش بیان Bax و کاسپاز ۳ یکی از مکانیسم‌های القای مرگ سلولی عصاره سیترولوس در سلول‌های سرطان کولون انسانی می‌باشد؛ ولی این موضوع نیازمند مطالعات بیشتر در سطح پروتئین است.

References

1. Aggarwal B., Prasad S., Sung B., Krishnan S. et al.; "Prevention and treatment of colorectal cancer by natural agents from mother nature", **Curr Colorectal Cancer Rep**; 9(1), 2013. pp.37-56.
2. Pourfarzi F., Whelan A., Kaldor J., Malekzadeh R.; "The role of diet and other environmental factors in the causation of gastric cancer in Iran--a population based study", **Int J Cancer**; 125, 2009, pp.1953-1960.
3. Fletcher R.; "The diagnosis of colorectal cancer in patients with symptoms: finding a needle in a haystack", **BMC Med**; 7, 2009, pp.18-29.
4. Subhashini J., Mahipal SV., Reddy MC., Reddy MM. et al.; "Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562", **Biochem pharmacol**; 68(3), 2004, pp.453-462.
5. Fernandez E., La Vecchia C., Talamini R., Negri E.; "Joint effects of family history and adult life dietary risk factors on colorectal cancer risk", **Epidemiology**; 13, 2002 pp.360-363.
6. Mahboubi E., Kmet J., Cook PJ., Ghadirian P. et al.; "Oesophageal cancer studies in the Caspian Littoral of Iran: The Caspian Cancer registry", **Br J Cancer**; 28, 1973, pp.197-214.
7. Tavakkol Afshari J., Rakhshandeh H., Zamani AR., Mahdavi Sh. et al.; "Cytotoxicity effects of Citrullus colocynthis on Hep2 and L929 cell lines", **Hakim Research Journal**; 8(2), 2005, pp.47-54.
8. Liu T., Zhang M., Zhang H., Sun C. et al.; "Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma", **Eur Arch Otorhinolaryngol**; 265, 2008, pp.1225-1232.
9. Lan T., Wang L., Xu Q., Liu W. et al.; "Growth inhibitory effect of cucurbitacin E on breast cancer cells", **Int J Clin Exp Pathol**; 6, 2013, pp.1799-1805.
10. Davoodi RS., Najafi M., Mazaheri M.; "Effect of Hydro Alcoholic Extract of Citrullus colocynthis fruit on Caspase 3 gene expression in MCF-7 breast cancer cell line", **J Shahid Sadoughi Univ Med Sci**; 23(5), 2015, pp.508-518.
11. Rezai M., Davoodi A., Asori M., Azadbakht M.; "Cytotoxic

activity of *Citrullus colocynthis* Schrad fruit extract on gastric adenocarcinoma and breast cancer cell lines”, **Int J Pharm Sci Rev Res**; 2017, 45(1).

Investigating the Effect and Function of Bacterial Toxins in the Treatment of Cancer

*Fatemeh Tohidi

**Fatemeh Khoramshandi

*** Hanie Najafi Delshad

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death in the human population worldwide. According to the World Health Organization (WHO), it is estimated that 6.6 million deaths in 2018 were due to cancer. Therefore, new treatment strategies have been developed as potential anti-cancer therapies to overcome this disease. Bacterial anti-cancer therapy is one of these new approaches in cancer treatment.

Compared to targeted cancer therapies, bacteria have a special place that is related to three unique characteristics of bacteria. Almost all tumors are hypoxic in terms of oxygen pressure, and anaerobic bacteria prefer this environment. In addition, bacteria are easily manipulated and can overcome the limitations of conventional cancer treatments. Also, unlike other treatments such as radiation therapy, bacterial therapy has a good penetration into tumor tissues. Bacterial toxins have already been tested as a treatment for cancer. These toxins either kill cells directly or alter cellular processes by altering cell control, proliferation, apoptosis, and differentiation. Changes in any of these processes can stimulate the cell or inhibit the cell's natural controls, resulting in carcinogenesis.

Bacteria such as *Clostridium botulinum*, *Pseudomonas aeruginosa*,

***BS. Student in Cellular and Molecular Biology, Ale-Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran.

***BS. Student in Cellular and Molecular Biology, Ale-Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran.

Streptococcus pyogenes have been able to interfere with the activity of cancer cells by producing toxins and have a very positive effect. Given the need for modern science to achieve new techniques in the treatment of cancer, this review study examined the function of some toxins and the bacteria that produce them.

Keywords: Bacterial toxin, treatment, Cancer.

بررسی تأثیر و نحوه عملکرد توکسین‌های باکتریایی در درمان سرطان

*فاطمه توحیدی

**فاطمه خرم شندی

**هانیه نجفی

چکیده

سرطان یکی از مهم‌ترین دلایل مرگ‌ومیر در میان جمعیت انسانی در سراسر جهان است. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) تخمین زده می‌شود ۶/۶ میلیون مرگ‌ومیر در سال ۲۰۱۸ ناشی از سرطان بوده است. بنابراین استراتژی‌های درمانی جدید به عنوان درمان‌های بالقوه ضد سرطانی برای غلبه بر این بیماری توسعه یافته‌اند. درمان ضد سرطان باکتریایی، یکی از این رویکردهای جدید در درمان سرطان است. در مقایسه با درمان‌های هدفمند سرطان، باکتری‌ها جایگاه خاصی دارند که مربوط به سه ویژگی منحصر به فرد باکتری‌ها می‌باشد. تقریباً همه تومورها از نظر فشار اکسیژن پایین یا هیپوکسی‌اند و باکتری‌های بی‌هوازی این محیط را ترجیح می‌دهند. علاوه بر این باکتری‌ها به آسانی قابل دستکاری بوده و می‌توانند بر محدودیت‌هایی که برای درمان‌های معمول سرطان وجود دارد غلبه کنند. هم چنین برخلاف سایر درمان‌ها هم چون اشعه درمانی، درمان باکتریایی نفوذ مناسبی در بافت‌های توموری دارد. سموم باکتریایی قبلاً به عنوان درمان سرطان آزمایش شده‌اند. این سموم سلول‌ها را یا به طور مستقیم از بین می‌برند یا فرایندهای سلولی را تغییر می‌دهد بطوریکه کنترل تکثیر، آپوپتوز و تمایز سلول را تغییر می‌دهند. تغییرات در هر یک از این فرایندها می‌تواند سلول را تحریک کرده و یا کنترل‌های طبیعی سلول را مهار کند و

* دکتری تخصصی میکروبیولوژی (نویسنده مسئول). biologyscience.tohidi@gmail.com

** دانشجوی کارشناسی، رشته زیست شناسی سلولی و ملکولی، دپارتمان زیست شناسی، مؤسسه غیرانتفاعی غیردولتی آل‌طه، تهران، ایران.

** دانشجوی کارشناسی، رشته زیست شناسی سلولی و ملکولی، دپارتمان زیست شناسی، مؤسسه غیرانتفاعی غیردولتی آل‌طه، تهران، ایران.

در نتیجه منجر به سرطان‌زایی شود. باکتری‌هایی نظیر *کلسترید-یوم بوتولینوم*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استرپتوکوکوس پیوژنز* با تولید سموم خود توانسته‌اند در فعالیت سلول‌های سرطانی مداخله کنند و تأثیر بسیار مثبتی داشته باشند. با توجه به نیاز علم امروز برای دستیابی به تکنیک‌های جدید در درمان بیماری سرطان، در این مطالعه مروری به بررسی نحوه عملکرد برخی توکسین‌ها و باکتری‌های تولید کننده آنها پرداخته شد.

واژگان کلیدی: توکسین باکتریایی، درمان، سرطان.

مقدمه

سرطان یکی از کشنده‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان است. در بسیاری از موارد تشخیص دیرنگام به طور معمول مسئول مرگ و میر بالای سرطان می‌باشد. درمان‌های مرسوم مانند شیمی‌درمانی و اشعه‌درمانی گاهی تأثیر چندانی ندارد که علت آن پیشرفت تومور، مقاومت به درمان و عدم اختصاصیت درمان برای تومور می‌باشد. باکتری‌ها می‌توانند به طور اختصاصی تومورها را هدف قرار دهند و به طور فعال در بافت نفوذ کرده و به شکل کنترل‌شده‌ای ایجاد سمیت کنند [۱]. در طول دهه گذشته سالمونلا، کلستریدیوم و جنس‌های دیگر، کنترل رشد تومور و ارتقای بقا در مدل‌های حیوانی را نشان داده‌اند. باکتری‌ها به روش‌های مختلف در درمان سرطان به کار می‌روند که از جمله آنها به کارگیری توکسین‌های باکتریایی در درمان این بیماری است [۲].

زهرابه یا توکسین مواد زیان‌آوری‌اند که توسط موجودات زنده از جمله حیوانات، گیاهان، باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. توکسین‌های باکتریایی را به طور کلی می‌توان به دو دسته تقسیم‌بندی کرد: اندوتوکسین‌ها (Endotoxins) که از اجزای دیواره سلولی باکتریایی مانند غشای خارجی می‌باشند و پس از لیزباکتری، به درون محیط آزاد می‌شوند که بارزترین مثال آن لیپوپلی ساکارید (LPS) باکتریایی در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. دسته دیگر از توکسین‌های باکتریایی، اگزوتوکسین‌ها (Exotoxins) هستند که به طور عمده از جنس پروتئین بوده، به درون محیط زندگی باکتری ترشح می‌شوند. اثر دوگانه‌ای که این سموم دارند، سبب جذابیت و ضرورت مطالعه بر این جزء باکتریایی می‌گردد. مکانیسم به کارگیری باکتری‌ها به پنج دسته تقسیم می‌شود: ۱- به صورت کاملاً زنده، ضعیف یا اصلاح‌شده ژنتیکی؛ ۲- حامل یا vector که خود به دو دسته عوامل تومورکش و حامل‌های آنزیم باکتریایی تقسیم می‌شود؛ ۳- عوامل ایمنی درمانی؛ ۴- توکسین: به صورت متصل به لیگاند و متصل به آنتی‌ژن‌های سطح تومور؛ ۵- اسپور [۳، ۷ و ۱۸].

توکسین‌ها در باکتری‌ها مکانیسم‌های متفاوتی را بروز می‌دهند؛ برای مثال توکسین‌های «ستافیلوکوکوس/اورئوس» را به سه دسته می‌توان تقسیم کرد.

۱- توکسین‌هایی که غشا را درگیر می‌کنند: این توکسین‌ها با ایجاد روزنه روی غشای سلولی سبب نشت محتویات حیاتی داخل سلولی به بیرون شده، سلول میزبان را با مشکل جدی مواجه می‌کنند. توکسین‌های آسیب‌زننده به غشای سلولی خود دارای دو زیرگروه می‌باشند: گروه اول وابسته به واکنش اولیه با رستپورها سطح سلول بوده، اختصاصیت ویژه بالایی دارند. گروه دوم اختصاصیت کمتری داشته، نیازشان به رستپورها کمتر است. آلفا توکسین معروف‌ترین توکسین‌های آسیب‌زننده به غشا با واسطه رستپور می‌باشند که از جمله اولین توکسین‌های ایجادکننده لیز در گویچه‌های قرمز و برخی گلبول‌های سفیدند [۴ و ۱۸].

۲- توکسین‌هایی که با عملکرد رستپور تداخل دارند، ولی بر آن اثر نمی‌گذارند: انتروتوکسین‌ها توکسین‌هایی با وزن ۲۰ تا ۳۰ کیلو دالتون‌اند که در عملکرد روده‌ها تداخل ایجاد کرده، سبب بروز حالت تهوع و استفراغ می‌شوند. انتروتوکسین‌ها سوپر آنتی‌ژن‌هایی‌اند که سبب فعال‌شدن T-cell‌ها می‌شوند. این فرایند بدون نیاز به پروسه فعال‌سازی MHC کلاس II صورت می‌پذیرد [۴ و ۱۸].

۳- توکسین‌هایی با خاصیت آنزیمی: اکثر آنزیم‌های مترشحه از باکتری‌ها سبب تخریب مولکول‌های میزبان یا تداخل با متابولیسم میزبان می‌گردند. تعدادی از این آنزیم‌ها عبارت‌اند از: پروتئازها: سبب تخریب پروتئین‌های میزبان شده و در نتیجه باعث تخریب بافت می‌گردند. lysine Urea پروتئازی است که سبب تخریب طیف وسیعی از پروتئین‌ها می‌شود، استافیلوکینازها و بتا توکسین «ستافیلوکوکوس/اورئوس»: یک اسفنگومیلیناز تایپ III بوده و سبب تخریب اسفنگومیلین سطوح سلول‌های میزبان شده و در نهایت باعث لیز و از بین رفتن سلول می‌گردد. لیپاز و نوکلئازها که هنوز اثر آنها در پاتوژنیسته باکتری زیاد مشخص نیست، اما مشاهده شد که لیپاز سبب تضعیف نوتروفیل‌ها می‌شود [۴ و ۱۸].

در حال حاضر «نوروتوکسین‌های بوتولینوم» یکی از قوی‌ترین سموم شناخته‌شده در جهان‌اند. این توکسین‌ها دارای ساختار پلی‌پپتیدی بوده و از دو زنجیره سنگین و سبک که به واسطه یک پیوند دی‌سولفیدی به هم وصل شده‌اند، تشکیل شده است. زنجیره سبک یک متالوئوپتیداز است که به واسطه زنجیره سنگین وارد پایانه‌های عصبی شده و با تجزیه و شکست پروتئین‌های موسوم به مجموعه SNARE مانع ترشح ناقلان عصبی به‌خصوص استیل‌کولین می‌شود. بدین ترتیب موجب فلجی شده و درنهایت منجر به مرگ می‌گردد [۵].

۱. اثر توکسین‌های باکتریایی در مهار و درمان سرطان

سموم باکتریایی قبلاً به عنوان درمان سرطان آزمایش شده‌اند. این سموم سلول‌ها را یا به طور مستقیم از بین می‌برند یا فرایندهای سلولی را تغییر می‌دهند؛ به طوری که کنترل تکثیر، آپوپتوز و تمایز را تغییر می‌دهند [۶]. تغییرات در هر یک از این فرایندها می‌تواند سلول را تحریک کرده یا کنترل‌های طبیعی سلول را مهار کند و درنتیجه منجر به سرطان‌زایی شود. سموم باکتریایی که چرخه سلولی یوکاریوتی میزبان را مختل می‌کنند، به عنوان سیکلومودولین (Cyclomodulins) طبقه‌بندی شده‌اند؛ برای مثال CNF یک محرک چرخه سلولی است که توسط باکتری‌های خاصی مانند *E. coli* آزاد می‌شود. CNF انتقال G1-S را آغاز می‌کند و باعث تکثیر DNA می‌شود. تعداد سلول‌ها افزایش نمی‌یابد. در عوض، سلول‌ها چند هسته‌ای می‌شوند. این عمل می‌تواند به دلیل توانایی سم در مهار تمایز سلول و آپوپتوز باشد [۱۸ و ۱۹]. برخی سموم باکتریایی با اتصال به آنتی‌ژن‌های موجود در سطح تومور عمل می‌کنند. سم دیفتیری (DT) به سطح سلول‌هایی که بیانگر فاکتور رشد اپیدرمی متصل‌کننده هپارین مانند فاکتور رشد (HB-EGF) می‌باشد، متصل می‌شود. مجموع DT-HB-EGF پس از اندوسیتوز از طریق وزیکول‌کلاترین وارد می‌شود. متعاقب آن DT تحت چندین تغییر پس از ترجمه قرار می‌گیرد که منجر به ایجاد یک سم کاتالستی فعال به نام قطعه DT می‌شود. همانند DT،

اگزوتوکسین A سودوموناس نیز به طور کاتالستی شناخته می‌شود که ریبوزیله‌کننده EF-2 بوده و در نتیجه منجر به مهار سنتز پروتئین می‌شود. یک مطالعه جدید برای اولین بار نشان داده است نورو توکسین بوتولینوم (BoNT) به طور خلاصه رگ‌های توموری را باز می‌کند و با استفاده از رادیوتراپی و شیمی‌درمانی، تخریب مؤثرتر سلول‌های سرطانی را امکان‌پذیر می‌کند [۲۰].

اگزوتوکسین سودوموناس (PE)، سم دیفتری (DT) از مهم‌ترین عوامل مرگ سلول‌اند. این امر با ترکیب سموم به پروتئین‌های اتصال‌دهنده سلولی مانند آنتی‌بادی‌های مونوکلونال یا فاکتورهای رشد به دست می‌آید و از این طریق از ارتباط آنها با گیرنده‌های سم جلوگیری می‌شود. اخیراً یک اگزوتوکسین نو ترکیب ایتترلوکین ۴- سودوموناس (IL4-PE) برای درمان گلیوبلاستوما تولید شده است. همان طور که در بالا اشاره شد، آلفا توکسین «ستافیلوکوکوس / اورئوس» از توکسین‌های آسیب‌زننده به غشا با واسطه رسپتور می‌باشد که از دسته توکسین‌هایی است که سبب همولیز سلول‌های خونی می‌گردد. در حال حاضر از آلفا توکسین «ستافیلوکوکوس / اورئوس» روی دو رده سلولی، سلول‌های مزوتلیوما (Mesothelioma) (P31) و سلول‌های کوچک سرطان ریه (U-1690) مورد مطالعه قرار می‌گیرند [۷].

۱-۱. اثر توکسین‌های باکتریایی در مهار و درمان سرطان سینه

مطالعات نشان می‌دهد سم دیفتری گرفته‌شده از کورینه باکتریوم دیفتری (DT) روی رده‌های سلولی MCF 7 در درمان سرطان سینه و دیگر سرطان‌ها از جمله سرطان غده فوق کلیوی، سرطان روده بزرگ و برخی موارد دیگر نقش داشته است. مکانیسم عمل این توکسین بدین گونه است که DT ترکیبی از دو زیر واحد "A" و "B" است. زیر واحد "B" وظیفه اتصال به گیرنده و جابه‌جایی زیر واحد "A" با ADP- ریبوزیلاسیون سیتوپلاسمی دارد که فاکتور ۲ افزایش طول سنتز پروتئین (EF-2) را مهار می‌کند و بنابراین منجر به مرگ سلول می‌شود [۸]. توکسین‌های دیگری نیز وجود دارد که در اینجا به چند مورد دیگر اشاره می‌کنیم (جدول ۱).

توکسین	منشأ	رده سلول سرطان سینه	مکانیسم عمل
بوتولینوم نوروتوکسین نوع A	کلستریدیوم بوتولینوم	T47D, MDA-MB- 231, MDA- MB-453	از طریق فعالیت آپوپتوتیک، کاهش رشد و تکثیر سلول
اگزوتوکسین A	سودوموناس آئروژینوزا	MCF-7, BT-20, CAMA-1, SKBR-3	در ترکیب با آنتی‌بادی‌های تومور انتخابی پستان (MAB)، ایمونوتوکسین‌ها را با اثر سمیت سلولی روی رده سلول‌های سرطان پستان تشکیل می‌دهد.
اگزوتوکسین T	سودوموناس آئروژینوزا	MDA-MB- 231, EMT6, 4T1	از طریق سیستم ترشح (T3SS) III ترشح می‌کند و پاتوژن را تسهیل می‌کند. ExoT شامل دو دومین است و هر دو دومین در آپوپتوز ناشی از ExoT کمک می‌کنند.
هیالورونیدازها	استرپتوکوکوس پیورنز	Hs578T, MDA-MB- 231, MCF-7	قادر به تخریب هیالورونان (HA) یکی از اجزای ECM است که در بسیاری از تومورهای جامد افزایش می‌یابد، منجر به کاهش کشش بافت تومور و افزایش فشار مایع بینابینی می‌شود.

۲-۱. اثر توکسین‌های باکتریایی در مهار و درمان سرطان مثانه

سرطان مثانه شایع است و سالانه تقریباً ۷۰,۰۰۰ نفر در کل دنیا مبتلا به این سرطان تشخیص داده شدند. گزینه‌های درمانی در زمان عود بیماری شامل جراحی یا حتی سیستمی جراحی است. BGC نوعی واکسن زنده ضعیف‌شده است. سویه

«مایکوباکتریوم بوویس» با سابقه طولانی به عنوان فاکتوری در تولید واکسن سل در سطح جهان شناخته شده است. از طریق مکانیسم‌های خاص بیوشیمیایی، در این مورد، از طریق مهار فاکتور ۲ طویل‌سازی عمل کرده و از طرفی EGFR اغلب در سرطان مثانه بیان می‌شود و اعتقاد بر این است که نقش مهمی در پاتوژنز سرطان مثانه دارد [۹] و [۱۰].

۱-۳. اثر توکسین‌های باکتریایی در مهار و درمان سرطان پوست

FDA دنیلوکین را تأیید کرده است. دیفتیتوکس (ONTAK) یک پروتئین کایمیریک سم دیفتیری اصلاح‌شده (DT) و (IL-2) برای درمان لنفوم سلول T پوستی به کار برده شده است [۱۱].

۱-۴. توکسین‌های تشکیل‌دهنده منفذ

توکسین‌های تشکیل‌دهنده منفذ در غشای سلولی، نوعی توکسین‌های موجود بر روی غشای باکتری‌ها هستند که در غشای سلولی میزبان ایجاد حفره‌هایی پروتئینی به نام پور (Pore) می‌کنند که خاصیت نفوذپذیری انتخابی سلول را از بین می‌برند و از آنجا که سیتوپلاسم سلولی دارای پتانسیل اسمزی بالاتری نسبت به محیط بیرون سلولی می‌باشد، آب و الکترولیت‌ها به صورت کنترل‌نشده‌ای از طریق این کانال‌های ایجادشده، به درون سلول وارد شده و در نهایت سلول از بین می‌رود. این دسته از توکسین‌ها به نام توکسین‌های تشکیل‌دهنده منفذ معروف‌اند (Pore-forming toxins) (شکل ۲) [۱۲-۱۳].

شکل ۲: حالت عملکرد ایمونوتوکسین تشکیل‌دهنده منافذ: سموم تشکیل‌دهنده منافذ روی سلول به صورت اولیگومر در می‌آیند. بعد از شناسایی گیرنده که به ترتیب می‌توانند قند، لیپید یا پروتئین باشد، به آنها متصل شده و توکسین را به غشای پلاسمایی وارد می‌کند، اجازه عبور آزاد الکترولیت‌ها و دیگر مولکول‌های کوچک را می‌دهد و باعث عدم تعادل اسمزی می‌شود.

برای نمونه الیسین، سم اصلی تولیدشده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* است که

تعامل غشایی را کمتر نشان می‌دهد. این ماده از یک مولکول آب دوست و یک زنجیره تشکیل شده است که باید توسط شکاف پروتئولیتیک قبل از وارد شدن به غشا، فعال شود. تلاش‌های زیادی برای طراحی ایمونوتوکسین‌های ایجادکننده منفذ صورت گرفته است؛ اما استفاده از آنها هنوز مشخص نیست. با این حال PFITها ممکن است برای درمان ترکیبی با شیمی‌درمانی استفاده شوند. این نوع توکسین‌ها با ایجاد منفذ ورود سایر داروها به سلول‌های سرطانی را تسهیل می‌کنند [۱۳].

۳. مزایا و معایب سموم و اسپورهای باکتریایی در سرطان درمانی

استفاده از سموم باکتریایی می‌تواند مخاطراتی را در پی داشته باشد؛ اما در مقابل می‌تواند مزایایی نیز به همراه داشته باشد. با توجه به شیوه‌های مرسوم شیمی‌درمانی، پرتو درمانی و روش‌های تهاجمی که هر کدام عوارض خاص خود را دارا هستند، مطالعه روی شیوه‌های جدید می‌تواند راهی برای درمانی امن‌تر و با هزینه کمتر باشد [۱۴]. در ادامه در جدول ۲ به بررسی مزایا و معایب توکسین‌های باکتریایی می‌پردازیم.

جدول ۲: مزایا و معایب توکسین‌های باکتریایی

مزایا	معایب
قدرت انتخاب بالای تومور توسط باکتری‌های بی‌هوازی اجباری	ایمنی زایی سلول‌های باکتریایی منجر به پاسخ ایمنی میزبان به دنبال عفونت می‌شود، از فعالیت بیشتر باکتری‌ها جلوگیری می‌کند.
باکتری‌های ممکن است به راحتی برای غلبه بر محدودیت‌های مهندسی دست کاری شوند.	لیز ناقص تومور
باکتری‌ها متحرک‌اند و به طور فعال حرکت می‌کنند و به دور از عروق، به عمق نسوج نفوذ کرده، در بافت تومور جمع می‌شود.	القای شوک سپتیک (عفونی) به دلیل ایمنی‌زایی بالا
باکتری درمانی به نفوذ کافی در بافت‌های دسترسی دارد که سایر درمان‌ها، از جمله	سمیت ذاتی باکتریایی

شیمی درمانی و پرتودرمانی امکان دسترسی به آنها نیست.	
سلول‌های رویشی جوانه زده از اسپورهای باکتریایی بعداً با آنتی‌بیوتیک از بین می‌روند، بنابراین سمیتی رخ نمی‌دهد.	غیرقابل دسترسی بودن؛ چراکه در بیشتر موارد تزریق مستقیم تومور مورد نیاز است.

۳. نقش ایمونولوژیک سموم باکتریایی در ایمونوتراپی سرطان

ایمنی درمانی سرطان پاسخ ایمنی خاصی را در بیماران سرطانی ایجاد می‌کند تا به انواع مختلف سلول‌های ایمنی میزبان، اجازه حمله به سلول‌های سرطانی را بدهد. هنگامی که سلول‌های ایمنی میزبان (عمدتاً سیتوتوکسیک اختصاصی آنتی‌ژن تومور و لنفوسیت‌های T کمکی) فعال می‌شوند، قادر به تشخیص تومور بوده و سلول‌های توموری را از بین می‌برند. سلول‌های دندریتیک که سلول‌های حرفه‌ای ارائه‌دهنده آنتی‌ژن هستند، توسط Hsp70 بالغ شده و سلول‌های دندریتیک بالغ برای پاسخ‌های ایمنی ویژه آنتی‌ژن خاص مورد نیازند. PAMPها به گیرنده‌های TLR متصل می‌شوند و آنها را فعال می‌کنند و باعث تنظیم مولکول‌های محرک CD40 و سیتوکین‌های پیش‌التهابی (IL-12) می‌شوند. سرانجام این مواد شیمیایی باعث تولید ایتترفرون گاما (IFN- γ) می‌شود و یک واکنش وابسته به Th1 سلول وابسته به Th1، اساساً توسط لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک آغاز می‌شود [۱۵].

۴. مکانیسم‌هایی که توسط آن باکتری‌ها تومورها را هدف قرار می‌دهند

پس از تجویز سیستمیک، باکتری‌ها در محیط ریز تومور قرار می‌گیرند. فعل و انفعالات بین باکتری‌ها، سلول‌های سرطانی و محیط ریز اطراف باعث تغییرات مختلفی در سلول‌های ایمنی نفوذپذیر تومور می‌شود و سیتوکین‌ها و کموکین‌ها بیشتر رگرسیون تومور را تسهیل می‌کنند [۱۶]. به طور کلی این مکانیسم‌ها عبارتند از: ۱. سموم باکتریایی حاصل از «سالمونلا تیفی موریوم»، لیستریا و کلستریدیوم می‌توانند سلول‌های تومور را مستقیماً با ایجاد آپوپتوز یا اتوفازی از بین ببرند. سموم

تحویل داده شده از طریق سالمونلا می‌توانند تنظیم مجدد کانکسین ۴۳ (Cx43) را در پی داشته، منجر به ایجاد اتصالات باکتریایی در بین تومور و سلول‌های دندریتیک (DC) شوند که امکان ارائه متقابل آنتی‌ژن‌های تومور به DCs31-33 را فراهم می‌کند. ۲. پس از قرارگرفتن در معرض آنتی‌ژن‌های تومور و تعامل با اجزای باکتریایی، DCها مقدار زیادی سیتوکین پیش‌التهابی IL-1 β ترشح می‌کنند که متعاقباً سلول‌های CD8⁺ T را فعال می‌کند. ۳. پاسخ ضد توموری سلول‌های CD8⁺ T فعال شده توسط فلاژلین باکتری (پروتئین) بیشتر می‌شود. «زیر واحد تازک باکتریایی» از طریق فعال‌سازی TLR5 پروتئین‌های پرفورین و گرانزیم که توسط سلول‌های فعال شده CD8⁺ T ترشح می‌شوند، به طور مؤثر تومور را از بین می‌برند. ۴. فلاژلین و TLR5 سیگنالینگ همچنین باعث کاهش فراوانی سلول‌های T (Treg) نظارتی CD4⁺ CD25⁺ می‌شود که متعاقباً پاسخ ضد توموری سلول‌های CD8⁺ T فعال شده را بهبود می‌بخشد. ۵. فلاژلین «سالمونلا تیفی موریوم» سلول‌های NK را تحریک به تولید می‌کند. اینترفرون- γ (IFN- γ) یک سیتوکین مهم برای ایمنی ذاتی و تطبیقی است. ۶. MDSCهای آلوده به لیستریا به یک سیستم تحریک ایمنی تبدیل می‌شوند. فنوتیپ با افزایش تولید IL-12 مشخص می‌شود که سلول‌های CD8⁺ T و پاسخ‌ها را بیشتر افزایش می‌دهد. ۷. هم «سالمونلا تیفی موریوم» و هم عفونت کلستریدیوم می‌توانند تجمع قابل توجه نوتروفیل‌ها را تحریک کنند. افزایش ترشح TNF- α و القاکننده آپوپتوز مربوط به TNF لیگاند 45 (TRAIL) توسط نوتروفیل‌ها باعث افزایش پاسخ ایمنی و از بین بردن سلول‌های توموری با القای آپوپتوز می‌شود. ۸. التهاب ماکروفاژ فعال شده از طریق تماس با اجزای باکتریایی (LPS) و فلاژلین و سلول‌های سرطانی آسیب‌دیده به سالمونلا، منجر به افزایش ترشح IL-1 β و TNF- α در محیط ریزتومور می‌شود [۱۷].

۵. بحث

استفاده از روش‌های درمان بیولوژیکی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها در درمان

سرطان از ۱۵ سال پیش در جهان مورد توجه است؛ اما در کشور ما یکی از جدیدترین روش‌های تحقیقاتی توسط محققان حوزه میکروبی‌شناسی به حساب می‌آید. در مقایسه با درمان‌های هدفمند سرطان باکتری‌ها جایگاه خاصی دارند. تقریباً همه تومورها از نظر فشار اکسیژن پایین یا هیپوکسی هستند. بنابراین استفاده از باکتری‌های بی‌هوازی که این محیط را ترجیح می‌دهند، گزینه مناسبی می‌تواند باشد [۱۸]. علاوه بر این باکتری‌ها به آسانی قابل دستکاری بوده، می‌توانند بر محدودیت‌هایی که برای درمان‌های معمول سرطان وجود دارد، غلبه کنند [۱۹]. همچنین بر خلاف سایر درمان‌ها همچون اشعه‌درمانی، درمان باکتریایی نفوذ مناسبی در بافت‌های توموری دارد. با وجود این، ایرادهای درمان باکتریایی مربوط به ماهیت توکسیک باکتری‌ها و نیز ناپایداری ژنتیکی آنها را نمی‌توان نادیده گرفت. به منظور غلبه بر این مشکلات تالش‌های قابل توجهی انجام شده است؛ از آن جمله می‌توان به استفاده از باکتری‌های مهندسی‌شده و ضعیف‌شده، تکنولوژی DNA نو ترکیب و نیز به کاربردن همزمان این درمان با درمان‌های دیگر همچون شیمی‌درمانی، پروتئین‌های شوک حرارتی فلزات سنگین و تابش اشاره کرد [۲۰]. از آنجا که توکسین‌های باکتریایی از جنس پروتئین‌اند، بسیار ایمونوژن هستند و سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند و در نتیجه این تحریک علیه آنها آنتی‌بادی اختصاصی ساخته می‌شود که موجب خنثی‌شدن توکسین می‌گردد. البته در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) امکان دارد آنتی‌بادی به طور کامل توکسین را خنثی نکند که این امر نشان می‌دهد شاخص‌های آنتی‌ژنی توکسین الزاماً جایگاه فعال توکسین نیست؛ اما از آنجا که توکسین‌ها در شرایط داخل بدن (in vivo) به صورت کامل توسط آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، خنثی می‌شوند، می‌توان نتیجه گرفت فاکتورهای دیگری در ایمنی میزبان جهت خنثی‌کردن توکسین نقش ایفا می‌کنند [۵، ۶ و ۲۰].

نتیجه‌گیری

کاربردهای مختلفی از باکتری‌ها شامل، باکتری‌های زنده و ضعیف‌شده به عنوان عوامل ضد سرطان و وکتورهای حامل عوامل درمانی، اسپورها به عنوان عوامل سازگار

با محیط و شرایط توموری و توکسین‌های باکتریایی ضد سلول‌های سرطانی تا کنون بررسی شده است. این نتایج، درمان باکتریایی سرطان را به عنوان درمانی امیدبخش برای سرطان مطرح می‌سازد. علاوه بر این کاربردهای متنوعی از باکتری به منظور درمان سرطان با تکیه بر دانش پایه علیه سرطان در فاز ۱ کارآزمایی بالینی بیماران سرطانی است. با توجه به ناتوانی درمان‌های مرسوم مانند شیمی‌درمانی و اشعه‌درمانی در مراحل پیشرفته تومور، مقاومت به درمان و عدم اختصاصیت این شیوه‌های درمان، امید است با پیشرفت مطالعه‌ها در این زمینه یک بعد جدید به درمان سرطان اضافه شود.

منابع و مآخذ

۱. حمزه‌پور، سیاوش و مریم نجفی؛ «نوروتوکسین‌های بوتولینوم، یک تهدید واقعی از بیوتروریسم»، فصلنامه پرستار و پزشک در رزم؛ ش ۱۳، س ۴، زمستان ۱۳۹۵.
۲. نوری، نادر و المیرا دژکام؛ «توکسین‌های /استافیلوکوکوس /اورئوس»، فصلنامه آزمایشگاه و تشخیص؛ ش ۳۸، زمستان ۱۳۹۶.
۳. رنجبر رضا؛ روش‌های مختلف تشخیص توکسین‌ها»، طب نظامی؛ ش ۱۰، بهار ۱۳۸۷.
۴. سلطانی، صابر؛ ابوالفضل داودآبادی، عباس فراهانی، مهسا دسترنج، معصومه امینی، نوید مؤمنی‌فر، شیرین پورعبدی و حجت ویسی؛ «مروری بر انواع ایمونوتوکسین‌ها و کاربرد آنها در درمان سرطان»، مجله دانشکده پزشکی؛ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۷۶، ش ۱، فروردین ۱۳۹۷، ص ۱۲-۱۸.
۵. داریوش عسگرپور و دکتر حبیب ضیغمی؛ «نقش انتروتوکسین‌های /استافیلوکوکوس /اورئوس در مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی» فصلنامه آزمایشگاه و تشخیص، ش ۲۸، تابستان ۱۳۹۴، ص ۶۳-۷۳.
۶. قزوینی، کیارش و هادی صفدری؛ «بررسی آلودگی‌های باکتریایی لوازم آرایشی مصرفی در اطراف چشم در قبل و پس از مصرف در ایران»، پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، دوره ۳۱، ش ۲، تابستان ۱۳۸۶، ص ۱۵۹-۱۶۲.
۷. یعقوبی، هاجر، مژگان بنده‌پور و بهرام کاظمی؛ «کاربرد باکتری‌ها در درمان سرطان»، مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی دوره ششم، ش ۲۴، پاییز ۱۳۹۵.
8. Yaghoubi, y. A., Khazaei M., Hasanian M., Avan A., William C. Cho, Soleimanpour S.; "Bacteriotherapy in Breast Cancer", Int. J.

-
- Mol; Sci.2019. 20(23), 5880.
9. Thi-Quynh Duong M., Qin Y., You S., Min J.; Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy, Duong et al. Experimental & Molecular Medicine, 2019, 51(12):p; 1-15.
 10. Song SH., Vuai M., Zhong M.; “The role of bacteria in cancer therapy – enemies in the past, but allies at present, Song et al. Infectious Agents and Cancer, 2018, 15; p; 13:9.
 11. Weerakkody R., Witharana CH.; “The role of bacterial toxins and spores in cancer therapy”, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Colombo, Colombo, Sri Lanka, 2019, 235;116839.
 12. Yang X., Kessler E., Su L., Thorburn A., Frankel A., Li Y., G. La Rosa F., Shen J., Li CH., Varella-Garcia M., Glode M., W. Flaig TH., “Diphtheria Toxin–Epidermal Growth Factor Fusion Protein DAB389EGF for the Treatment of Bladder Cancer”, 2013.12-1258.
 13. N. Imene Zahaf, and G. Schmidt, “Bacterial Toxins for Cancer Therapy”, Institute for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, 2017. 28.
 14. S. Patyar, R. Joshi, DS. Prasad Byrav, A. Prakash, B. Medhi, and BK. Das; “Review Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy”, Patyar et al. Journal of Biomedical Science, 2010.
 15. J. Rafter; “Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective”, Department of Medical Nutrition, Karolinska Institute, NOVUM, S-86-141 Huddinge, Sweden, British Journal of Nutrition 2002, 88: 1, s89-s94.
 16. S. A. Al-Hilu, and W. H. Al-Shujairi; “Dual Role of Bacteria in Carcinoma: Stimulation and Inhibition”, Hindawi International Journal of Microbiology; 2020, p; 15-24.
 17. Giampietro Schiavo, F. Gisou van der Goot. The bacterial toxin toolkit, natural reviews, molecular, cell biology, 2001, 2, p; 530-537.
 18. Lihini Ranisha Weerakkody, Chamindri Witharana, The role of bacterial toxins and spores in cancer therapy, Life Sciences, 2019, 235, 116839.
 19. Michel R. Popoff, Bacterial Toxins” Section in the Journal Toxins: A Fantastic Multidisciplinary Interplay between Bacterial Pathogenicity Mechanisms, Physiological Processes, Genomic Evolution, and Subsequent Development of Identification Methods,

Efficient Treatment, and Prevention of Toxigenic Bacteria, Toxins, 2018, 10, p; 44.

20. Julien Barbier, Daniel Gillet, Engineering of bacterial toxins for research and medicine, The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition), 2015.

Application of Plasmonic Biosensors to Detect Different Types of Viruses with Emphasis on COVID-19 Virus

* Saeideh Zaghian

** Sohamseh Mohebbi

*** Zahra Amini-bayat

**** Neda Mousavi-Niri

Abstract

Since the beginning of the new millennium, virus replication and transmission have become a threat to biosecurity around the world, such as Acute Respiratory Syndrome (SARS) in 2002, pandemic Swine Flu in 2009, the West African Ebola outbreak in 2014, and the last but not least pandemic of COVID-19. A pandemic is a threat to the lives of people all over the world, and early detection of viral infections and disease control have always been vital. Under these circumstances, highly sensitive and selective detection techniques are increasingly urgent. Scientists' experience has shown that virus detection is based on various plasmonic phenomena, including enhanced superficial plasmon resonance (SPR), localized SPR or LSPR, increased surface Raman scattering or SERS, and surface

* Department of Nanoscience Technology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

** Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Basic Sciences, Ale-Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran
(Corresponding author). E-mail:s.mohebbi@aletaha.ac.ir

***Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology and Pharmaceutical Industries, Iran Scientific and Industrial Research Organization, Tehran, Iran

****Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Modern Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

infrared absorption spectroscopy (SERIA) can be very useful. It can be rightly acknowledged that nano biosensors are a promising new tool for virus detection. The present study covers some of the available information on the identification of plasmonic virus-based sensors. This data will help the audience advance research and development of a new generation of biosensors for virus detection, including detecting the target structure of viruses such as nucleic acids or proteins.

Keywords: Nanobiosensor, Virus Detection, Plasmonic Biosensor, Covid-19, SERS.

کاربرد حسگرهای زیستی پلاسمونیک برای تشخیص انواع ویروس‌ها با تأکید بر ویروس COVID-19

*سعیده زاغیان
**سهامه محبی
***زهرا امینی بیات
****ندا موسوی-نیری

چکیده

از آغاز هزاره جدید، تکثیر و انتقال ویروس‌ها به تهدیدی برای امنیت زیستی در سراسر جهان تبدیل شده است که نمونه آن، سندرم حاد تنفسی حاد (SARS) در سال ۲۰۰۲، آنفلوآنزای خونی همه‌گیر در سال ۲۰۰۹، شیوع ابولا در آفریقای غربی در سال ۲۰۱۴ و آخرین همه‌گیری یا همان COVID-19 است. همه‌گیری بیماری، تهدیدی برای جان جمعیت تمام کره زمین است و تشخیص بموقع عفونت ویروسی و کنترل بیماری همیشه حیاتی بوده است. در این شرایط، تکنیک‌های تشخیص بسیار حساس و انتخابی دارای فوریت فزاینده‌ای هستند. تجربیات دانشمندان نشان داده که تشخیص ویروس بر اساس پدیده‌های مختلف پلاسمونیک، از جمله تشدید رزونانس پلاسمون سطحی (SPR)، SPR موضعی یا LSPR، پراکندگی رامان سطح افزایش یافته یا SERS و طیف سنجی جذب مادون قرمز سطح یا SERIA افزایش می‌یابد. نانوزیست‌حسگرها یک ابزار امیدوارکننده جدید برای تشخیص ویروس‌اند. بررسی حاضر بخشی از اطلاعات موجود در زمینه

* گروه نانوزیست فناوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
** نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست فناوری، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی آل طه، تهران، ایران.
E-mail: s.mohebbi@aletaha.ac.ir
*** استادیار، گروه زیست فناوری پزشکی و صنایع دارویی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.
**** استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

شناسایی ویروس مبتنی بر خاصیت پلاسمونیک را پوشش می‌دهد. این داده‌ها به مخاطبان در پیش برد تحقیق و توسعه نسل جدید حسگرهای زیستی برای تشخیص ویروس شامل تشخیص ساختار هدف ویروس‌ها مانند اسیدهای نوکلئیک یا پروتئین‌ها کمک می‌کند.

واژگان کلیدی: نانو زیست‌حسگر، شناسایی ویروس، حسگرهای پلاسمونی، کرونا ویروس، تشدید پلاسمون سطحی.

مقدمه

بشر همواره با افزایش خطرات ناشی از ظهور و بازگشت بیماری‌های عفونی ویروسی مانند ویروس آنفلوانزا، ویروس دنگی (DENV)، ویروس نقص ایمنی انسانی، آنفلوانزای خوک، ویروس ابولا، ویروس سندرم حاد تنفسی حاد و آخرین، اما نه پایانی، به نام کرونا ویروس مواجه بوده است [۱،۲]. این ویروس‌ها به سرعت در حال شیوع‌اند و از این رو تهدیدی برای سلامتی انسان به شمار می‌روند که با تأثیرات اقتصادی و اجتماعی قابل توجه جهانی همراه‌اند. این ویروس‌ها، پروتئین‌های ویژه‌ای برای اتصال به سلول میزبان دارند. آنها از طریق اندام‌های ما وارد بدن شده، به دنبال آن یک فرایند بیماری‌زایی را ایجاد می‌کنند؛ سیستم ایمنی بدن را تضعیف و چندین علامت اساسی مانند سرفه، سرماخوردگی و تب را ایجاد می‌کنند که منجر به التهاب ریه و گاهی اوقات نارسایی عضو و حتی مرگ می‌شود؛ برای مثال کوید ۱۹ به راحتی به سلول‌های ریه متصل می‌شود و باعث ذات‌الریه و نفس‌تنگی می‌شود. طبق داده‌های به دست آمده از منابع مختلف، طی قرن گذشته همه‌گیری‌های ویروسی منجر به مرگ میلیون‌ها نفر شده است. در حال حاضر، جهان با نوع جدیدی از سارس-کوید ۲ مبارزه می‌کند. سازمان بهداشت جهانی این شیوع را در ۳۰ ژانویه ۲۰۲۰ به عنوان یک اورژانس بهداشت عمومی اعلام کرد و بیماری را COVID-19 نامید [۳]. تا دوم نوامبر سال ۲۰۲۰، ۴۶.۸ میلیون نفر توسط COVID-19 و شمارش آلوده شده‌اند که تقریباً ۰.۴ میلیون نفر در روز افزایش می‌یابد. برای به حداقل رساندن آسیب‌های ناشی از این همه‌گیری و افزایش آمادگی برای ظهور مجدد کوید ۱۹ در آینده و سایر موارد همه‌گیر، سامانه‌های تشخیص سریع و بموقع به سرعت مورد نیاز است. روش‌های مرسوم تشخیص ویروس، معمولاً به یک روش خاص مانند تعیین توالی ژن، کشت سلول، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، جداسازی ویروس، آزمایش هم‌گلوتیناسیون، روش الایزا، ایمونوپراکسیداز و غیره نیاز دارند [۴،۵،۶]. به طور کلی این تکنیک‌ها گران بوده و شامل ابزارهای پیچیده‌ای‌اند که نیاز به کار متخصص دارند و نیز دارای زمان پاسخ-

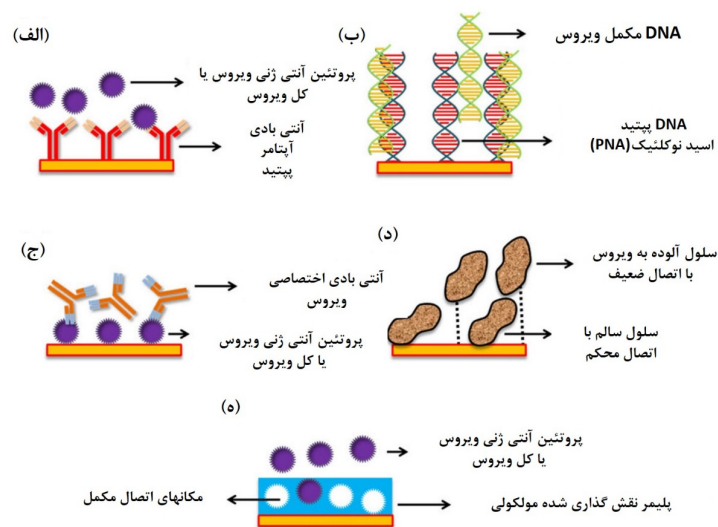
دهی بالا و غیره‌اند. علاوه بر این پروتکل‌های توسعه‌یافته آنها معمولاً به انواع ویروس‌ها محدود می‌شود. در اینجا زیست‌حسگرهای مبتنی بر پلاسمونیک ابزاری جایگزین ارائه می‌دهد که قبلاً به عنوان یک روش جدید بسیار حساس و امیدوارکننده برای تشخیص سریع ویروس‌ها، توجه جامعه علمی را به خود جلب کرده است. این تکنیک همچنین با مزایای عملکرد آسان، حداقل پیش‌نمونه و ابزار دقیق ساده و غیر گران‌قیمت همراه است. مقاله حاضر نمایانگر بررسی بخشی از حسگرهای مبتنی بر پلاسمونیک برای تشخیص ویروس است. در بخش اول، انواع مختلفی از اهداف ویروسی و عناصر شناسایی مربوطه ارائه می‌شود و اصول اولیه تکنیک‌های پلاسمونیک مانند تشدید رزونانس پلاسمون سطحی (SPR)، تشدید پلاسمون سطحی موضعی (LSPR)، پراکندگی رامان سطح افزایش‌یافته (SERS)، فلورسانس سطح افزایش‌یافته (SEF) و طیف‌سنجی جذب مادون قرمز سطح افزایش‌یافته (SEIRA) ارائه می‌شود که به طور خلاصه بحث می‌شوند. سپس داده‌های جامعی در مورد استفاده از این تکنیک‌ها در جهت توسعه روش‌های تشخیص ویروس، همراه با بحث در مورد چند مطالعه به‌ویژه موارد مربوط به COVID-19 ارائه شده است.

(۱) اهداف ویروسی و عناصر شناسایی

یک حسگر زیستی عمومی دارای سه عنصر اصلی است: هدف، شناساگر و عنصر مبدل. هدف، مولکول آنالیت است که وقتی توسط عنصر شناساگر از طریق برخی فعل و انفعالات خاص جذب می‌شود، مورد شناسایی قرار می‌گیرد. پس از اتصال با مولکول هدف، عنصر تشخیص حسگر در یکی از خصوصیات فیزیکی یا شیمیایی خود مانند رسانایی، ضریب شکست (RI)، مقدار pH و غیره تغییر می‌کند. این تغییر با تبدیل به سیگنال قابل خواندن ترجمه می‌شود [۷]. مبدل با در نظر گرفتن انواع مختلف عناصر شناسایی و اهداف ویروس طراحی می‌شود. حسگرهای زیستی ویروسی را می‌توان به پنج دسته مختلف تقسیم کرد: حسگرهای زیستی مبتنی بر پاسخ‌های ایمنی، DNA، آنتی‌ژن، سلول و مولکول [۱]. حسگرهای ایمنی معمولاً بر اساس فعل و انفعال بین آنتی‌ژن ویروسی و آنتی‌بادی‌های مربوطه‌اند. در واکنش به مولکول ویروس یا ارگانسم

ویروس مهمان، سیستم ایمنی بدن انسان/ حیوان میزبان آنتی‌بادی تولید می‌کند [۸]. این آنتی‌بادی‌ها می‌توانند در برابر یک پروتئین ویروسی، آنتی‌بادی دیگر یا حتی یک ویروس کامل تولید شده و با میل و ویژگی بالا متصل شوند؛ از این رو آنتی‌بادی‌های تولیدشده به طور گسترده‌ای به عنوان گیرنده‌های زیستی برای تشخیص آنتی‌ژن‌های ویروسی انتخابی استفاده می‌شوند. در حسگرهای ایمنی از آپتامرها نیز به عنوان عنصر تشخیص استفاده می‌شود [۹]. این اولیگونوکلوئوتیدهای تک‌ رشته‌ای (ssDNA) یا ssRNA) یا مولکول‌های پپتید، به آنتی‌ژن‌های ویروسی هدف با انتخاب و میل زیاد متصل می‌شوند [۱۰]. تشخیص مبتنی بر آپتامرهای DNA، به جهت‌گیری ترجیحی آنها با توجه به ویروس هدف متکی است که با تفاوت‌های ساختاری ظریف همراه می‌شود. در مقابل، آپتامرهای پپتیدی با تقلید از آنتی‌بادی‌ها کار می‌کنند و از طریق سایت‌های تشخیص انتخابی روی سطح حسگر مهندسی می‌شوند [۱۱]. تشخیص ویروس بر اساس DNA به عنوان عنصر شناسایی با تثبیت ssDNA بر سطح حسگر با واکنش-پذیری حفظ شده، پایداری و قابلیت دسترسی به DNA ویروس هدف حاصل می‌شود و به هیبریداسیون اسیدنوکلئیک بستگی دارد [۱۲]. آنتی‌ژن‌های سطحی -مانند پروتئین‌ها و پاکت‌های نوکلئوکسپید- یا ذرات کامل ویروس به عنوان گیرنده‌های سطحی برای تشخیص آنتی‌بادی‌های خاص ویروس، از سرم انسانی آلوده، در زیست‌حسگرهای ویروسی مبتنی بر آنتی‌ژن به دست می‌آیند [۱۳]. دقت و کاربرد این حسگرها با غلظت آنتی‌بادی تولیدشده طی مراحل مختلف عفونت محدود می‌شود. زیست‌حسگر مبتنی بر سلول به طور گسترده‌ای به عنوان یک جایگزین بالقوه برای آزمایش روی حیوانات، به منظور بررسی بیماری‌های ویروسی استفاده می‌شود. این حسگرها با عامل‌دار کردن سلول‌ها قبل و بعد از آلوده شدن روی سطح حسگر ساخته می‌شوند و اجازه می‌دهند تجزیه و تحلیل دقیق عفونت ویروسی، از جمله اثرات سیتوپاتیک مورد مطالعه قرار گیرد [۱۴]. این تأثیرها شامل اطلاعات جمع‌آوری شده از اتصال یا جداشدن ویروس، تغییرات مورفولوژیکی، تخریب غشای ویروسی و درنهایت

مرگ سلولی است. برای حسگرهای زیستی مبتنی بر پلیمر چاپی مولکولی (MIP= Molecular Imprinted Polymer)، مکان‌های شناسایی ساخته‌شده، حفره‌های مکمل در یک ماتریس پلیمری‌اند که مجموعه آنتی‌ژن-آنتی‌بادی‌های ویروسی هدف، ساخته شده و روی سطح حسگر رسوب می‌کنند. این روش میل ترکیبی و انتخاب قابل مقایسه را با توجه به عناصر بیولوژیکی، همراه با افزایش پایداری در محیط‌های سخت، قابلیت استفاده مجدد و مقرون‌به‌صرفه بودن نشان می‌دهد. یک تصویر شماتیک از حسگرهای زیستی مورد بحث در بالا در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱. انواع مختلف حسگرهای زیستی مبتنی بر عامل و اهداف ویروس. یک حسگر ایمنی -یا زیست‌حسگر مبتنی بر آنتی‌بادی-، زیست‌حسگر مبتنی بر DNA، زیست‌حسگر مبتنی بر آنتی‌ژن، حسگر زیستی مبتنی بر سلول و حسگرهای زیستی مبتنی بر چاپ مولکولی.

۲) حسگرهای پلاسماونی برای تشخیص ویروس

روش‌های مبدل سنجش متداول، مانند الکتروشیمیایی (پتانسیومتری آمپومتريک، ایمپدیمتری و کالری‌متری) و کروماتوگرافی یا حساسیت جرمی بسیار گسترش

یافته‌اند. این تکنیک‌ها به‌ویژه الکتروشیمیایی، در زمینه‌های بهداشت، غذا، کشاورزی و غیره مورد توجه تحقیقات و صنایع قرار گرفته است. در نتیجه طیف گسترده‌ای از حسگرهای ویروسی معمولی در جامعه علمی ایجاد شده است [۱۵، ۱۶]. حسگرهای پلاسمونیک به مدت ۴۰ سال در دست ساخت بوده و در این مدت هزاران مقاله تحقیقاتی، حق ثبت اختراع و چند ده دستگاه تجاری پدیدار شده است [۱۷]. دلیل این امر آن است که این حسگرها دارای مزایای مختلفی در مقایسه با روش‌های معمولی‌اند؛ از جمله: (۱) منطبق با زمان (Real-Time) برای کشف پویایی اتصال به منظور مشاهده تعاملات زیستی مختلف بین مولکول‌های زیستی؛ (۲) تشخیص بدون برچسب؛ (۳) قابلیت استفاده مجدد زیاد؛ (۴) زمان پاسخ کوتاه؛ (۵) درمان‌های نمونه ساده، همراه با استفاده از حداقل اجزای الکتریکی.

با این حال حسگرهای پلاسمونیک معایبی هم دارند؛ از جمله (۱) اختصاصی بودن سطح اتصال - که می‌توان آن را از طریق تثبیت لایه انتخابی آنالیت روی فیلم پلاسمونیک افزایش داد؛ (۲) محدودیت تحمل جرم؛ (۳) مانع استریک در حین رویداد اتصال؛ (۴) خطر سوء تعبیر اطلاعات در هنگام رویدادهای معمول [۱۸]. این بخش به روش‌های اصلی پلاسمونیکی اختصاص دارد که می‌تواند برای تولید انواع حسگرهای ویروسی مورد استفاده قرار گیرد. این روش‌ها شامل SPR ، LSPR ، SER ، SERS و SEIRA می‌باشد.

۳) حسگرهای مبتنی بر SPR

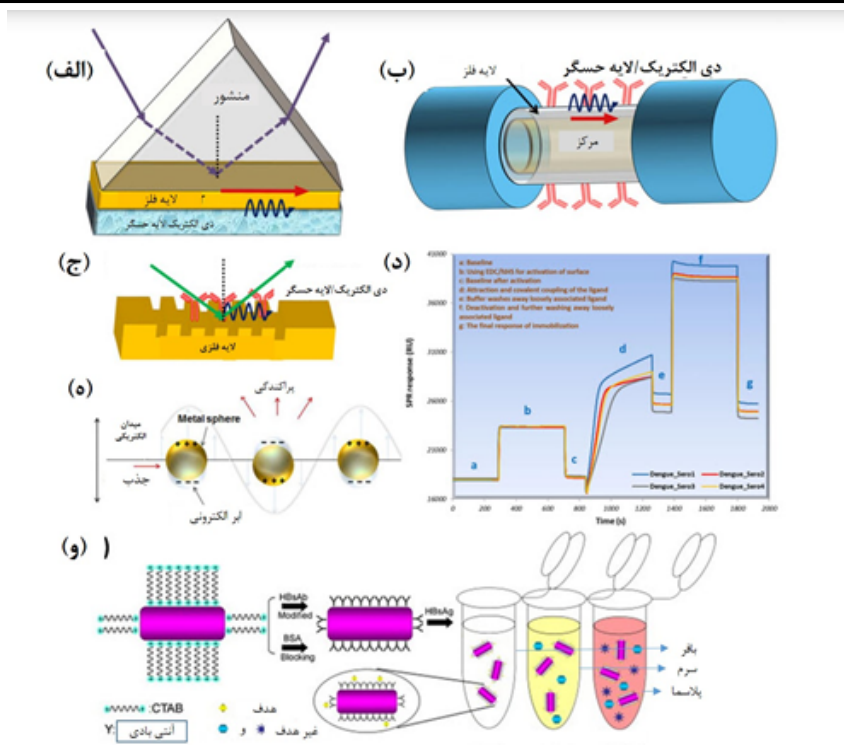
پلاسمون سطحی به نوسانات منسجم الکترون‌های لایه رسانا در سطوح فلزات گفته می‌شود که با استفاده از تابش الکترومغناطیس در سطح میان فلز و دی‌الکتریک به وجود می‌آید. با توجه به حساسیت پلاسمون‌های سطحی به تغییرات ضریب شکست سطح فلز، می‌توان از این پدیده به عنوان ابزاری برای حسگرهای نوری استفاده کرد. پلاریتون پلاسمون سطحی (Surface Plasmon Polariton) یا به طور خلاصه SPR یک تکنیک نوری به طور گسترده در دسترس است که برای مشاهده تغییرات ضریب شکست

(Refractive index) حسگر پس از اتصال مولکول هدف استفاده می‌شود [۱۹]. این تکنیک به تشدید الکترومغناطیسی (Electromagnetic Resonance) نوسانات جمعی الکترون‌های آزاد مرتبط با یک فلز پلاسمونیک (نقره و طلا برای طیف قابل مشاهده) یا سطح نیمه دی‌الکتریک اشاره دارد. این تشدید باعث ایجاد یک میدان الکترومغناطیسی منتشرشونده سطحی در امتداد سطح دی‌الکتریک فلز می‌شود که به طور نمایی در هر دو محیط تحلیل می‌رود. این قسمت نسبت به تغییر RI لایه دی‌الکتریک بسیار حساس است؛ به این معنی که می‌تواند به عنوان یک لایه حسگر برای تحقق حسگرهای مبتنی بر SPR استفاده شود [۲۰، ۲۱]. تحریک SPR برای تأمین حرکت فوتونی لازم در طول سطح، به یک اتصال جفت‌شده نیاز دارد. این را می‌توان با استفاده از منشور با شاخص بالا (High-index prism)، گریتنینگ (Grating)، هدایت موج یا فیبر نوری به دست آورد. SPR به طور متداول از طریق اتصال منشوری (روشی معروف به پیکربندی کرشمن (Kretschmann configuration) [۲۲] به دست می‌آید؛ جایی که نور از طریق یک منشور با شاخص بالا روی یک سطح از یک فیلم طلا عبور می‌کند و انعکاس داخلی کامل را در سطح مشترک منشور و فلز تسهیل می‌کند.

شکل ۲ (الف-ج) به ترتیب چندین پیکربندی اصلی ایجادشده برای دستیابی به SPR را با توجه به کاربردهای مورد نیاز ارائه داده است. توسعه حسگرهای مبتنی بر SPR توسط کرشمن و ریدر در سال ۱۹۶۸ آغاز شد. آنها پیکربندی متعارف مبتنی بر منشور را معرفی کردند [۲۲]. از آن زمان، تحقیقات مبتنی بر SPR با توسعه چندین پیکربندی و ترکیب مواد برای افزایش عملکرد این حسگرها نسبت به برنامه‌های مراقبت از مرکز (POC= Kretschmann configuration)، رشد چشمگیری داشته است. امروزه شرکت‌های زیادی مانند Biacore، PhotonicSys، Plasmetrix و دیگران دستگاه‌هایی را برای ارزیابی عملکرد حسگرهای مبتنی بر تراشه برای دستگاه‌های POC تولید می‌کنند. برای تولید حسگرهای مبتنی بر تراشه، لایه حسگر روی یک سوبسترای شیشه‌ای با پوشش فلز نازک (~ 50 نانومتر) آماده می‌شود و آنالیت در یک کانال میکروسیال در مجاورت لایه حسگر جریان می‌یابد تا بتواند آن را تشخیص دهد. همان

طور که گفته شد، این نوع حسگرهای مبتنی بر تراشه مزایای مختلفی دارند؛ مانند (۱) تشخیص بدون برچسب که با حذف عامل دارکردن چندین آنتی‌بادی مانند ELISA، دستگاه سنجش را ساده می‌کند؛ (۲) اندازه‌گیری دینامیکی سینتیک اتصال-عدم اتصال، برای مشاهده مکانیسم واکنش رخ داده روی سطح حسگر؛ (۳) حساسیت بالا. تراشه‌های استاندارد SPR همچنین معایب متعددی دارند که شامل محدودیت در نور پلاریزه مغناطیسی عرضی، انتخاب‌پذیری کم و عمق نفوذ کم است. اگرچه عمق نفوذ کوچک (۲۰۰-۳۰۰ نانومتر) مزیتی است که امکان سنجش خاصیت‌های زیستی یا مولکول‌ها در مجاورت سطح پلاسمونیک نانومقیاس را فراهم می‌کند، اما در صورت بزرگ‌بودن نمونه مورد مطالعه، مانند باکتری‌ها یا سلول‌ها، عمق نفوذ بالاتر لازم است. با این حال با اصلاح تراشه، مانند استفاده از تراشه‌های دوربرد SPR، این مانع برطرف می‌شود [۲۱].

جهان‌شاهی و همکاران یک روش تشخیص سریع آنتی‌بادی ایمونوگلوبولین M (IgM) با استفاده از سروتیپ DENV به عنوان یک گیرنده روی تراشه طلا پیشنهاد کردند [۲۳]. پروب شناساگر، کاربرد در نمونه‌های سرم انسانی همراه با انتخاب ۱۰۰٪ و زمان پاسخ ده دقیقه را نشان داد. پاسخ حسگر ساخته‌شده در هر مرحله تثبیت در شکل ۲ d ارائه شده است. از SPR همچنین برای تعیین کمیت و ارزیابی سینتیک ویروس کرونا (SARS-CoV) که در سال‌های ۲۰۰۲-۲۰۰۳ ظهور کرد، استفاده شد. در یک مطالعه، سینتیک اتصال SARS-CoV با RNA طی فسفوریلاسیون نوکلئوپروتئین SARS-CoV (پروتئین N) ارزیابی شد [۲۵]. این مطالعه نشان داد پروتئین N فسفریله و غیر فسفریله میل اتصال مشابهی به RNA ویروسی را نشان داد. با این حال در مقایسه با RNA غیر ویروسی، میل اتصال بالاتر پروتئین N فسفریله مشاهده شد که فسفوریلاسیون پروتئین N را برای تشخیص RNA ویروسی تحریک می‌کند. مشاهده شد که عنصر اصلی ویروس نه تنها به عنوان یک محل اتصال برای پروتئین N عمل می‌کند، بلکه باعث اتصال با میل بالا برای مناطق دیگر می‌شود.



شکل ۲- پیکربندی‌های مختلف متداول برای دستیابی به SPR.

(الف) مبتنی بر منشور؛ (ب) بر اساس فیبر نوری؛ (ج) بر اساس گریتنینگ؛ (د) پاسخ SPR در حین ساخت حسگر با استفاده از تثبیت چهار سروتپ آنتی ژن دانه در هر مرحله که برای تشخیص آنتی بادی IgM DENV استفاده می‌شود [۲۳]: (ه) LSPR رفتار نانوسفر فلزی در یک میدان الکترومغناطیس خارجی [۱۹]؛ (و) نانومیلای طلای فعال شده با آنتی‌بادی برای مکانیسم تشخیص آنتی ژن HBs و کاربرد آن در ماتریس-های مختلف [۲۵].

در مطالعه دیگری، یک حسگر مبتنی بر SPR برای تشخیص ساده و آسان ویروس کرونا با استفاده از پروتئین تولیدشده از طریق همجوشی پلی‌پپتیدهای متصل به طلا (GBP) ساخته شد [۲۶]. پروتئین‌ها روی لایه طلا تثبیت شده و به عنوان لیگاند برای آنتی‌ژن سطح SARS-CoV استفاده می‌شود. حسگر پیشنهادی در غلظت بهینه شده پروتئین همجوشی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بهترین عملکرد را دارد. حد تشخیص و

زمان پاسخگویی حسگر به ترتیب ۲۰۰ نانوگرم در میلی لیتر و ۱۰ دقیقه گزارش شد.

۴) حسگرهای مبتنی بر LSPR

LSPR یکی دیگر از کاندیداهای بالقوه تحقق بیوحسگرهای پلاسمونی با حساسیت بالاست که یک دسته از پدیده‌های SPR است؛ جایی که میدان الکترومغناطیس تشدیدشده به نانو ساختار فلزی محدود شده و نسبت به تغییر RI محیط اطراف آن فقط در عرض چند دهم نانومتر حساس است. در مورد نانوذرات کلوئیدی با جهت‌گیری تصادفی، اثرات پراکندگی و جذب غالب‌اند. محققان از نانو حسگرهای مبتنی بر LSPR برای شناسایی مواد شیمیایی و زیستی استفاده می‌کنند. در بیشتر این موارد، باند پلاسمونی به دلیل اتصال ویژه مولکول‌های مورد نظر به سطح، تغییر مکان می‌دهد که این تغییر باند به عنوان سیگنالی برای شناسایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در شرایط رزونانس، ارتفاع پیک LSPR و طول موج متناظر، به چندین پارامتر حساس‌اند: شکل، اندازه و مواد نانو ساختار پلاسمونیک و همچنین محیط اطراف آن که می‌تواند به عنوان محیط سنجش استفاده شود [۲۷]. ابعاد نانوذره، چندین ویژگی پلاسمونیک مانند طول موج رزونانس، نسبت پراکندگی به جذب و مقطع نابودی را تعیین می‌کند. این مطالعه نشان‌دهنده افزایش سریع خاموشی و سهم پراکندگی مربوطه با توجه به افزایش اندازه ساختار نانو است؛ اما اینها به نسبت ابعادی ساختارهای نانو وابسته نیستند. در مقایسه با نانوکره‌های طلا و نانو پوسته‌ها، نانومیله‌ها جذب و پراکندگی بیشتری نشان می‌دهند. نانومیله‌های با نسبت ابعاد بالا که دارای شعاع کوچک‌اند، بهترین جذب را نشان می‌دهند؛ در حالی که نانومیله‌های با نسبت ابعاد بالا با شعاع بزرگ، بالاترین کتتراست پراکندگی را نشان می‌دهند و می‌توانند برای کاربردهای تصویربرداری استفاده شوند. این حسگرها به طور کلی به وسیله ساخت نانو ساختارهای فلزی مانند نانوکره‌ها، نانومیله‌ها، نانوپوسته‌ها، نانوسیم‌ها، نانومنشورها و غیره و یک لایه پوششی از فیلم حسگر ساخته می‌شوند. تحولات تکنیک‌های نانولیتوگرافی ساخت این نانو ساختارها با قابلیت کنترل بسیار زیاد روی لایه‌های زیرین را امکان‌پذیر کرده است تا نه تنها با استفاده از ذرات

کلوئیدی، بلکه با استفاده از زیرلایه‌های مبتنی بر تراشه (Chip-based substrates) که مینیاتوری شده‌اند، از حسگرهای مبتنی بر LSPR با حساسیت و تکرارپذیری بالا استفاده کند و بتوانند با سایر اجزای حسگر مانند میکروسیالات و غیره ادغام شوند [۲۸]. پیشرفت در تکنیک‌های نانولیتوگرافی، فناوری نانو را قادر می‌سازد لایه‌های پلاسمونی مبتنی بر آرایه نانو را با سطح بزرگ‌تر و بازده بسیار کنترل‌شده توسعه دهد. این امر منجر به چندین عامل مفید با ترکیبی از سوبستراهای مسطح و کلوئیدی، از جمله تکرارپذیری زیاد، «نقاط داغ» میدان الکتریکی متمرکز زیاد (حدود یک میلیارد یا بیشتر در هر سانتی‌متر مربع) با باندهای SPR قابل تنظیم و توزیع میدان مربوطه می‌شود که با توجه به رویکرد انبوه متعارف، سهولت کوچک‌سازی، کاربرد برای ادغام با سایر اجزا -مانند میکروسیالات و غیره- منجر به افزایش حساسیت خواهد شد (Ibid). از مزایای LSPR در مقایسه با SPR می‌توان به این موارد اشاره کرد: نسبت ابعاد بالا که سبب در دسترس بودن سطح بیشتری برای میان‌کنش یا تثبیت عناصر سنجش می‌شود؛ یک پروب کوچک برای دستیابی به دستگاه‌های جمع و جور؛ قابلیت استفاده و سازگاری گسترده با چندین پدیده، مانند فلورسانس، طیف سنجی Raman و IR و موارد دیگر. از طرف دیگر از نظر حساسیت RI، حساسیت LSPR نسبت به SPR معمولی کمتر است [۲۹]، اما افزایش نسبت ابعادی، باعث اسکان آسان‌تر مولکول‌های زیستی در سطح سنجش روی نانوذر فلزی و در نتیجه حساسیت بالای بیومولکول می‌شود [۳۰]. با این حال چند تحقیق وجود دارد که SPR با LSPR همراه شده است تا بهترین عملکرد حسگر را به دست آورد. Wang به منظور تحقق LSPR برای یک حسگر تشخیص ویروس HBV، نانومیل‌های طلا و آنتی‌ژن سطح هپاتیت B (HBs) را به عنوان مولکول هدف مورد استفاده قرار داد. آنتی‌بادی‌های ضد HBs مونوکلونال بر سطح نانومیل‌های طلا از طریق یک فرایند جذب فیزیکی تثبیت شدند. عملکرد حسگر برای نمونه‌های بافر تریس، سرم خون و پلاسمای خون با موفقیت نشان داده شد. شکل شماتیک از تثبیت آنتی‌بادی روی نانومیل‌های طلا و کاربرد آن برای به دام انداختن HBV در شکل ۲- (و) نشان داده شده است.

برای تشخیص سریع نوروویروس انسان (NoV)، یک حسگر رنگ‌سنجی مبتنی بر نانوذرات طلا با استفاده از آیتامر بسیار خاص و فعالیت آنزیمی افزایش‌یافته توسط ویراسانگ و همکاران گزارش شده است [۳۱]. قابلیت اطمینان پروب حسگر برای تشخیص NoV در انواع مختلف ماتریس‌های پیچیده مانند سرم انسانی و غیره با موفقیت نشان داده شد؛ همچنین یک رویکرد جدید برای تشخیص مؤثر ویروس ابولا با ترکیب LSPR و لومینسانس منجر به انتقال انرژی تشدید لومینسانس توسط تسانگ و همکاران گزارش شده است [۳۲]. درباره بیماری همه‌گیر COVID-19، لی و همکاران تعیین سریع و آسان آنتی‌بادی‌های IgM و IgG مربوط به ویروس SARS-CoV-2 در سرم خون را گزارش کردند [۳]. آنتی‌بادی هدف IgG/ IgM در مرحله اول با یک آنتی‌ژن نوترکیب پروتئین S متصل به طلا از آنتی‌ژن SARS-CoV متصل می‌شود. کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن مورد سنجش که با آنتی‌بادی ضد انسانی که به غشای نیترو سلولز متصل شده بود، پیوند خورده بود، به دلیل پدیده LSPR، منجر به تغییر در رنگ کمپلکس متصل و تأیید ویروس SARS-CoV-2 با ویژگی بالا می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده قابلیت تشخیص قابل توجهی را برای نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از سرم خون، پلاسما و غیره نشان داد. روش دیگر برای تشخیص بالینی COVID-19 با استفاده از ادغام LSPR و اثر فوتوترمال پلاسمونی گزارش شد [۳۳]. در این روش، گیرنده‌های مکمل DNA به سمت SARS-CoV-2 روی نانوجزیره‌های دوبعدی طلا ($Au\ NI=$ Nanoislands 2D-Au) برای تشخیص حساس توالی‌های انتخاب‌شده از ویروس از طریق ترکیب اسید نوکلئیکی تثبیت شدند. سپس عملکرد حسگر از طریق گرمای ترموپلاسمونی تولیدشده در همان تراشه نانوجزیره‌های دوبعدی طلا هنگامی که در فرکانس تشدید پلاسمونی روشن می‌شود، بهبود یافت. این حسگر، تشخیص دقیق ویروس را با حد تشخیص پایین‌تر ۰.۲۲ پیکومولار به نمایش می‌گذارد. در جست‌وجوی روش‌های تشخیص SARS-CoV-2، یک روش انتخابی «چشم غیر مسلح» با استفاده از توالی‌های RNA آن به عنوان هدف، بدون استفاده از تکنیک‌های

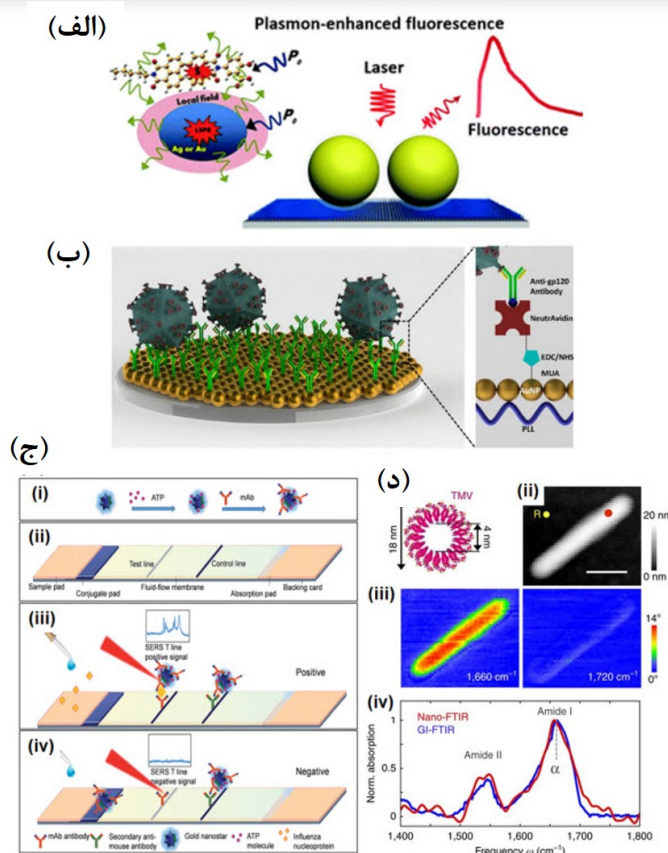
ابزار پیچیده ایجاد شد [۳۴]. تشخیص رنگ‌سنجی این توالی‌های RNA در جایی انجام شد که نانوذرات طلای کلئیدی با الیگونوکلوئوتیدهای آنتی‌سنس تیوله برای ژن N (فسفوپروتئین نوکلئوکپسید) SARS-CoV-2 پوشانده شد. مطالعه پیشنهادی تشخیص سریع بیماران مثبت COVID را طی ۱۰ دقیقه با استفاده از نمونه‌های جداشده RNA با انتخاب بالا و حد تشخیص ۰.۱۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر ارائه داد. این مطالعه در مقایسه با سایر روش‌های معمول، زمان پاسخ‌گویی بسیار کمی دارد.

۵) حسگرهای مبتنی بر SERS

طیف‌سنجی رامان تقویت‌یافته سطحی (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) با نام اختصاری SERS، تکنیکی است که در آن، طیف رامان برای شناسایی مولکول‌هایی که بر سطح فلزات جذب‌سطحی شده‌اند، به کار می‌رود. مزیت عمده این روش، شدت افزایش‌یافته پیک‌های رامان است که از درجه ۱۰^۴ تا ۱۰^{۱۴} می‌تواند تقویت شود و به همین علت حتی برای شناسایی یک مولکول منفرد و تک هم به کار می‌رود. پراکندگی رامان با جذب سطحی آنالیت یا مولکول هدف روی یک سوبسترای فلزی به طور چشم‌گیری افزایش می‌یابد. این اثر در فلزات نقره و طلا و مس قابل مشاهده است؛ اما در فلزات دیگر ناچیز است. دو مکانیسم عمده برای توجیه این اثر معرفی شده‌اند: اثر انتقال بار (CT= Charge transfer) و اثر میدان الکترومغناطیس (EME= Electromagnetic effect). به اثر انتقال بار اثر شیمیایی (Chemical effect) نیز گفته می‌شود.

در هر دو مکانیسم، وجود یک سطح زیر و ناهموار برای افزایش و ارتقای سیگنال ضروری است. در مکانیسم اثر میدان مغناطیسی، تشدید پلاسمون سطحی را عامل ارتقا و افزایش سیگنال می‌دانند. پلاسمون نوسانات جمعی و آزاد الکترون‌های لایه رسانش فلز از یک ذره به ذره دیگر است. نوسانات الکترون‌ها مشابه نوسان‌های ذرات محیط پلازماست؛ به همین علت این اثر را پلاسمون نام‌گذاری کرده‌اند. وقتی نور یا الکترون پراثرژی به سطح فلز بتابد، نوسانات جذب قوی در ناحیه مرئی نشان می‌دهند که به آن جذب پلاسمون سطح گفته می‌شود. در چند دهه گذشته، در میان چندین مبدل

زیست‌سنجی، SERS خود را به عنوان یک ابزار بسیار انتخابی و روش تحلیلی غالب در زمینه کاربردهای تشخیصی ثابت کرده است [۳۵] که دارای طیف گسترده‌ای از مزایاست: (۱) امضای اثر انگشت منحصر به فرد از آنالیت که باعث ایجاد قدرت انتخاب بالا می‌شود؛ (۲) روش آماده‌سازی آسان نمونه؛ (۳) عدم وجود سیگنال از محیط آنالیت که معمولاً مبتنی بر آب است؛ (۴) تشخیص تک-مولکولی؛ (۵) پتانسیل حسگری چندگانه با یک پرتوی لیزر منفرد؛ (۶) توان بالا؛ (۷) کاربرد POC با استفاده از کاوشگرهای قابل حمل رامن قابل حمل در بازار [۲۸]. از فناوری SERS برای افزایش سیگنال طبیعی رامن ضعیف با استفاده از خصوصیات نوری و شیمیایی نانومواد پلاسمونیک مجاور استفاده می‌شود [۳، ۳۶]. نانوساختارهای فلزی پلاسمونی دارای میدان الکترومغناطیس متمرکز در نتیجه LSPR هستند و با افزایش سطح مقطع پراکندگی رامن در صورت نزدیک‌بودن نانوذرات پلاسمونیک به ماده فعال رامن، در سیگنال رامن تأثیر می‌گذارند. این افزایش، به دلیل ترکیبی از دو نوع فرایند است - تقویت الکترومغناطیس و تقویت شیمیایی - اگرچه اولی در مقایسه با دومی سهم غالب دارد. اولی معمولاً سهم عمده بین 10^4 و 10^8 را دارد؛ در حالی که دیگری سهم 10 تا 100 را برای پیشرفت رامن دارد [۳۶، ۳۷، ۳۸]. از آنجا که میدان الکترومغناطیس محلی شده به دلیل LSPR به طور قابل توجهی بالاتر از نور تصادفی است، منجر به تشخیص سیگنال SERS از سطح مقطع بسیار کوچک ($10-30$ سانتی‌متر مربع در مولکول) می‌شود. بهینه‌سازی طراحی ساختار نانوسیمای پلاسمونیک می‌تواند حسگرهای SERS با عملکرد بالا ایجاد کند؛ زیرا تقویت میدان الکترومغناطیس، حساسیت، قابلیت تولید مجدد حسگرهای و کاربردهای صنعتی آن را تعیین می‌کند.



شکل ۳- (الف) حسگر پلاسمونیک افزایش یافته سطح.

طرح کلی از اصل فلورسانس افزایش سطح [۳۹]. (ب) سکوی تشخیص HIV بر روی آرایه نانوذره طلا [۴۰] (ج) تصویری از یک سیستم SERS مبتنی بر جریان جانبی ارائه شده است. (i) ساخت برجسب SERS AuNS - ATP - mAb ، (ii) دستگاه سنجش پیشنهاد شده و اصل کار سنسور (III) با و (IV) بدون نوکلئوپروتئین آنفلوانزا A [۳۷]. (د) نمونه‌ای از یک سکوی SEIRA برای نقشه‌برداری ویروس موزاییک تنباکو (i): (TMV) ساختار پروتئین TMV، (ii) تصویر توپوگرافی TMV روی بستر سیلیکون، IR (iii)، نقشه‌برداری فاز نزدیک میدان IR در دو فرکانس مختلف (۱۶۶۰ و ۱۷۲۰ بر سانتی‌متر)، (iv) طیف نانو-FTIR TMV [۴۱].

تشخیص توالی‌های اسیدنوکلئیک DENV با استفاده از تکنیک SERS روی تراشه نانوسیم دوفلزی طبقه‌بندی شد [۴۲]. پروب حسگر با ایجاد ساختاری شبیه موج از نانوکره‌های پلی‌استایرن ساخته شد و به‌ترتیب پوشش‌های نقره و طلا ساخته شد. سپس ssDNA مکمل تیوله DENV روی طلا تثبیت شد. سیگنال‌های SERS بدون هیچ شست‌وشویی، پس از یک واکنش واحد بر سطح تراشه جمع‌آوری و اندازه‌گیری شدند که استفاده از آن ساده و کم‌هزینه بود. این حسگر قادر بود DENV DNA را با حد تشخیص ۶ آتومول تشخیص دهد. روش سنجش جریان جانبی (LFIA) و SERS در مطالعه‌ای در مورد تشخیص نوکلئوپروتئین آنفلوانزا A بررسی گردید [۳۶]. نانوستاره‌های چند شاخه طلا-ATP (به عنوان گزارشگر رامان) سنتز و متصل شدند تا کمپلکس AuNS - ATP (Au nanostar) تشکیل شود. آنتی‌بادی‌ها پس از آن روی کمپلکس تثبیت شدند. نمونه‌های نوکلئوپروتئین از طریق نوار LFIA جریان یافته و از طریق آنتی‌بادی متصل به هم پیچیده AuNS-ATP متصل می‌شوند که مجدداً برای رسیدن به سنجش، به موقعیت آزمایش که کل مجموعه به آن متصل شده بود، مهاجرت می‌کنند. در موقعیت آزمایش، سیگنال SERS ضبط شد و حد تشخیص ۶.۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. شکل ۳ (ج) شماتیک پلتفرم حسگر و مکانیسم کار را ارائه می‌دهد.

۶) حسگرهای مبتنی بر SEIRA

SEIRA پدیده‌ای است که برای افزایش سیگنال جذب IR ماده هدف استفاده می‌شود. سیگنال IR که معمولاً با استفاده از طیف‌سنج IR تبدیل فوریه (FTIR) اندازه‌گیری می‌شود، از طریق ارتعاشات اتمی ماده به دست می‌آید. بنابراین به عنوان یک نشانگر زیستی انتخابی عمل می‌کند و می‌تواند برای تشخیص‌های مولکولی مورد استفاده قرار گیرد [۴۳]. اما با توجه به اینکه طول موج‌های سیگنال IR بسیار بیشتر از اندازه مولکول‌های هدف است، سیگنال‌های IR از طریق یک مقطع کوچک جمع می‌شوند که سیگنال را ضعیف می‌کند و به معنای حساسیت کمتر است. طیف‌سنجی SEIRA از طریق ترکیبی از طیف‌سنجی IR و رزونانس پلاسمونی موضعی حساسیت

قابل ملاحظه‌ای (چندین مرتبه بزرگ) را افزایش می‌دهد. مشابه SEF و SERS، SEIRA با قراردادن مواد مورد نظر در مجاورت نانومواد پلاسمونی به دست می‌آید. با این حال، به دلیل محدوده طول موج IR، مزایای انتخاب گسترده‌تری از مواد پلاسمونی مانند فلز، نیمه‌هادی‌ها، گرافن و غیره را دارد [۴۴]. تشدیدها در محدوده IR با طراحی ساختارهای نوع نانوآنتن مانند نانومیل‌های طلا با طول برابر با تعداد متعدد نصف طول موج مؤثر به دست می‌آیند. با وجود این ساخت این سازه‌ها به دقت بالا و تکنیک‌های پیشرفته ساخت نانو نیاز دارد و این روش را درکنار نیاز به تخصص کمی گران می‌کند. در مقایسه با سایر تکنیک‌های افزایش سطح (برای مثال SERS و SEF)، ضریب افزایش کمتر است (۱۰-۱۰۰۰)، اما سطح مقطع برای جذب IR چندین برابر بیشتر از SERS و SEF است. از معایب SEIRA این است که قله‌های جذب مادون قرمز مولکول‌های آلی زیادند و در طول موج‌های وسیع از ۱.۵ تا ۱۰ میکرومتر و بیشتر گسترش می‌یابند. در همان زمان، ساختارهای نوع نانوآنتن معمولاً به گونه‌ای طراحی می‌شوند که در محدوده باریکی از طول موج‌ها را تقویت کنند. از طرف دیگر در طیف‌سنجی‌های SERS و SEF، دامنه مورد علاقه طول موج حداکثر تا چند ده نانومتر گسترش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که حسگرهای زیستی پلاسمونیک پتانسیل زیادی برای تشخیص ویروس دارند. مزیت‌های کلی شامل نمونه‌برداری سریع، LOD پایین‌تر، دامنه خطی گسترده، حساسیت بالا و انتخاب بالاست. مشخص شده که سنسجش خاص مبتنی بر سیستم‌عامل‌های پلاسمونیک مانند SPR، LSPR، SEF، SERS و SEIRA دارای ویژگی‌های متمایزی است که آنها را برای کاربردهای مختلف مناسب می‌کند. هنوز هم استفاده از حسگرهای زیستی پلاسمونیک در دستگاه‌های POC برای تشخیص زودهنگام بیماری‌های ویروسی همچنان نوپا باقی مانده است. برای افزایش سطح آمادگی فناوری این حسگرها تا مرز تجاری‌سازی و کاربردهای واقعی، به تحقیق و توسعه بیشتر نیاز است. حسگرهای مبتنی بر رنگ که بر اساس LSPR پاسخ مثبت یا منفی می‌دهند، از نظر فیزیکی وجود دارند. با این حال حسگرهای کمی که بتوانند

غلظت بسیار کمتری را تشخیص دهند، وارد بازار نشده‌اند. دلیل آن، پروتکل‌های اتصال ویژه‌ای است که باید بیشتر توسعه داده شود تا بتوان مولکول مورد نیاز را از تعداد زیادی در نمونه انتخاب کرد. آنتی‌بادی‌ها، آپتامرها، پپتیدها و MIPها بیشترین وعده را در حل این مسئله می‌دهند و پیشرفت‌های اخیر در مورد برخی نشانه‌های خوب در مسیر درست وجود دارد. در نتیجه پلاسمونیک‌ها نقش مهمی در پیشرفت حسگرهای SARS-CoV-2 برای شناسایی سریع، کارآمد و مقرون به صرفه دارند. پیشرفت در روش‌های LSPR، SEF، SERS و SEIRA به موازات توسعه سریع عوامل خاص اتصال، باعث بهبود چشم‌انداز این روش‌ها در آینده نزدیک برای تشخیص بیماری‌های همه‌گیر می‌شود. همچنین با شناسایی مقرون به صرفه، ساده، سریع و خاص ویروس کرونا و در نتیجه کمک به کنترل بیماری همراه خواهد بود.

References

1. Cheng, M. S. and C. S. Toh; "Novel biosensing methodologies for ultrasensitive detection of viruses", **Analyst**; 138, 2013.
2. Krejcova, L., P. Michalek, M. M. Rodrigo, Z. Heger, S. Krizkova, M. Vaculovicova, D. Hynek, V. Adam and R. Kizek; "Nanoscale virus biosensors: state of the art", **Nanobiosensors in Disease Diagnosis**; 4, 2015, pp.47-66.
3. Li, Z., Y. Yi, X. Luo, N. Xiong, Y. Liu, S. Li, R. Sun, Y. Wang, B. Hu and W. Chen; "Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis", **Journal of medical virology**; 92(9), 2020, pp.1518-1524.
4. Cella, L. N., W. Chen, N. V. Myung and A. Mulchandani; "Single-walled carbon nanotube-based chemiresistive affinity biosensors for small molecules: Ultrasensitive glucose detection", **J. Am. Chem. Soc**; 132, 2010.
5. Esfandyarpour, R., H. Esfandyarpour, J. S. Harris and R. W. Davis; "Simulation and fabrication of a new novel 3D injectable biosensor for high throughput genomics and proteomics in a lab-on-a-chip device", **Nanotechnology**; 24(46), 2013, 465301.
6. Qasim, M., D. J. Lim, H. Park and D. Na; "Nanotechnology for diagnosis and treatment of infectious diseases", **J. Nanosci. Nanotechnol**; 14, 2014.
7. M.Karimi, S. A., S. Mohebbi; "Use of nanobiosensors in disease diagnosis", The 7th National Congress on Biology and Natural Sciences of Iran 7, 2020, p.7.
8. Kirsch, J., C. Siltanen, Q. Zhou, A. Revzin and A. Simonian; "Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine", **Chem. Soc. Rev**; 42, 2013.
9. S.Mohebbi, N. B., F.Charbgoo, Z.S.Farsani; "Nanotechnology RNA breakthrough for targeted release of RNA-based drugs using cell-based aptamers", **MEDICAL SCIENCES JOURNAL**; 29(4), 2019, p.8 (In Persion).
10. Tran, L. D., D. T. Nguyen, B. H. Nguyen, Q. P. Do and H. Nguyen; "Development of interdigitated arrays coated with functional polyaniline/MWCNT for electrochemical biodetection: application for human papilloma virus", **Talanta**;

- 85, 2011.
11. Ellington, A. D. and J. W. Szostak; "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands", **Nature**; 346, 1990.
 12. Liu, X., Z. Cheng, H. Fan, S. Ai and R. Han; "Electrochemical detection of avian influenza virus H5N1 gene sequence using a DNA aptamer immobilized onto a hybrid nanomaterial-modified electrode", **Electrochim. Acta**; 56, 2011.
 13. Escosura-Muñiz, A.; "Gold nanoparticle-based electrochemical magnetosensor for rapid detection of anti-hepatitis B virus antibodies in human serum", **Biosens. Bioelectron**; 26, 2010.
 14. Zheng, S., D. K. Kim, T. J. Park, S. J. Lee and S. Y. Lee; "Label-free optical diagnosis of hepatitis B virus with genetically engineered fusion proteins", **Talanta**, 82, 2010.
 15. Jensen, S. and A. R. Thomsen; "Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion"; **J. Virol**; 86, 2012.
 16. Ozer, T., B. J. Geiss and C. S. Henry; "Review—chemical and biological sensors for viral detection", **J. Electrochem. Soc**; 167, 2020.
 17. R.Amirinejad, Z. S. F., S.Mohebbi; "The Application of DNA-Functionalized Gold Nanoparticles for Detection of Metabolites and Nucleic Acids in Personalized Medicine", **Personalized Medicine**; 6(21), 2021, 7.
 18. Helmerhorst, E., D. J. Chandler, M. Nussio and C. D. Mamotte; "Real-time and label-free bio-sensing of molecular interactions by surface plasmon resonance: a laboratory medicine perspective"; **Clin. Biochem. Rev**; 33, 2012.
 19. Roh, S., T. Chung and B. Lee; "Overview of the characteristics of micro- and nano-structured surface plasmon resonance sensors"; **Sensors**; 11, 2011.
 20. Sharma, A. K., R. Jha and B. D. Gupta; "Fiber-optic sensors based on surface plasmon resonance: a comprehensive review", **IEEE Sens. J**; 7, 2007.
 21. Abdulhalim, I., M. Zourob and A. Lakhtakia; "Surface plasmon resonance for biosensing: a mini-review", **Electromagnetics**; 28, 2008.
 22. Kretschmann, E. and H. Raether; "Radiative decay of non-

- radiative surface plasmons excited by light", **Z. Naturforsch; Sect A** 23, 1968.
23. Jahanshahi, P., E. Zalnezhad, S. D. Sekaran and F. R. M. Adikan; "Rapid immunoglobulin M-based dengue diagnostic test using surface plasmon resonance biosensor", **Sci. Rep**; 4, 2014.
24. Chen, H.; "Mass spectroscopic characterization of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein and elucidation of the role of phosphorylation in RNA binding by using surface plasmon resonance", **J. Virol**; 79, 2005.
25. Wang, X.; "Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of hepatitis B virus in buffer, blood serum and plasma", **Biosens. Bioelectron**; 26, 2010.
26. Park, T. J., M. S. Hyun, H. J. Lee, S. Y. Lee and S. Ko; "A self-assembled fusion protein-based surface plasmon resonance biosensor for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome", **Talanta**; 79, 2009.
27. Nehl, C. L. and J. H. Hafner; "Shape-dependent plasmon resonances of gold nanoparticles", **J. Mater. Chem**; 18, 2008.
28. Li, M., S. K. Cushing and N. Wu; "Plasmon-enhanced optical sensors: a review", **Analyst**; 140, 2015.
29. Cao, J., E. Galbraith, T. Sun and K. Grattan; "Comparison of surface plasmon resonance and localized surface plasmon resonance-based optical fibre sensors", *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, 2011.
30. Mayer, K. M., J. H. Hafner and A. À. Antigen; "Localized surface plasmon resonance sensors", **Chem. Rev**; 111, 2011.
31. Weerathunge, P.; "Ultrasensitive colorimetric detection of murine norovirus using NanoZyme aptasensor", **Anal. Chem**; 91, 2019.
32. Tsang, M. K.; "Ultrasensitive detection of Ebola virus oligonucleotide based on upconversion nanoprobe/nanoporous membrane system", **ACS Nano**; 10, 2016.
33. Qiu, G., Z. Gai, Y. Tao, J. Schmitt, G. A. Kullak-Ublick and J. Wang; "Dual-functional plasmonic photothermal biosensors for highly accurate severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection", **ACS nano**; 14(5), 2020, pp.5268-5277.
34. Moitra, P.; "Selective naked-eye detection of SARS-CoV-2

- mediated by N gene targeted antisense oligonucleotide capped plasmonic nanoparticles", **ACS Nano**; 14, 2020.
35. Bantz, K. C.; "Recent progress in SERS biosensing", **Phys. Chem. Chem. Phys**; 13, 2011.
 36. Moore, T. J., A. S. Moody, T. D. Payne, G. M. Sarabia, A. R. Daniel and B. Sharma; "In vitro and in vivo SERS biosensing for disease diagnosis", **Biosensors**; 8(2), 2018, p.46.
 37. Le, R. u. E. C., E. Blackie, M. Meyer and P. G. Etchegoint; "Surface enhanced raman scattering enhancement factors: a comprehensive study", **J. Phys. Chem**; C 111, 2007.
 38. Maneepprakorn, W., S. Bamrungsap, C. Apiwat and N. Wiriyachaiporn; "Surface-enhanced Raman scattering based lateral flow immunochromatographic assay for sensitive influenza detection", **RSC Adv**; 6, 2016.
 39. Li, J. F., C. Y. Li and R. F. Aroca; "Plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy", **Chem. Soc. Rev**; 46, 2017.
 40. Inci, F.; "Nanoplasmonic quantitative detection of intact viruses from unprocessed whole blood"; **ACS Nano**; 7, 2013.
 41. Amenabar, I., S. Poly, W. Nuansing, E. H. Hubrich, A. A. Govyadinov, F. Huth, R. Krutokhvostov, L. Zhang, M. Knez and J. Heberle; "Structural analysis and mapping of individual protein complexes by infrared nanospectroscopy", **Nature communications**; 4(1), 2013, 1-9.
 42. Ngo, H.; "DNA bioassay-on-chip using SERS detection for dengue diagnosis", **Analyst**; 139, 2014.
 43. Yang, X.; "Nanomaterial-based plasmon-enhanced infrared spectroscopy", **Adv. Mater**; 30, 2018.
 44. Ataka, K. and J. Heberle; "Biochemical applications of surface-enhanced infrared absorption spectroscopy", **Anal. Bioanal. Chem**; 388, 2007.

Effect of Salinity and Drought Stress on some Quantitative and Qualitative Traits of Aloe Vera Medicinal Plant

*Hossein Zeinali

** Masoomeh Hasanbarani

Abstract

Aloe vera L. is from Liliaceae family with turgid lace-shaped green leaves with jagged edges and sharp points. Gel aloe is used in pharmaceuticals, folk medicine, healthcare, cosmetic products and food products. The objective of research was "study of salinity and drought stress effects on quantitative and qualitative traits of *Aloe vera*". This research was done in order to study of salinity and drought stress effects on quantitative and qualitative of *Aloe vera*. This experiment was carried out in split plot design with eight replications in green house. Factors were including different salinity levels (control, 4, 8 and 12 ds/m) and different drought stress (Fc(control), 40, 60, 80% depletion of availability water). Studied traits were including quantitative and qualitative parameters. Result showed that salinity and drought stress had negative effect on growth of *aloe vera* and decreased aerial yield, gel leaf content, main root length, wet and dry weight of root. Treat of more from 4 ds/m and 40% depletion of water availability was critical point of tolerance for this plant. With increasing of drought

**University lecturer, Biology Group, Department of Basic Science,
Ale-Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran (Corresponding
Author). E-mail: mh_plantbiology@yahoo.com

**University lecturer, Biology Group, Department of Basic Science,
Ale-Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran (Corresponding
Author). E-mail: mh_plantbiology@yahoo.com

and salinity stress deceraised economic yield including aerial yield and gel plant. Trend of decreasing was low such as this plant produced suitable yield even in 12 ds/m and 80% of water availability.

Keywords: Salinity, Drought stress, *Aloe vera*, Gel, Yield of *Aloe vera*.

اثر تنش شوری و خشکی بر برخی صفات کمی و کیفی گیاه دارویی آلوئه ورا

*حسین زینلی

**معصومه حسن بارانی

چکیده

گیاه صبرزرد (*Aloe vera*) از خانواده Liliaceae کاربرد زیادی در صنایع داروسازی، بهداشتی و غذایی دارد. هدف از این تحقیق «مطالعه اثرات شوری و خشکی روی صفات کمی و کیفی» این گیاه بود. این تحقیق در شرایط گلخانه‌ای به صورت آزمایش اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با هشت تکرار انجام شد. گیاهان تحت دو عامل شوری با هدایت الکتریکی شاهد (آب چاه با هدایت الکتریکی یک)، ۴، ۸ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر و تنش خشکی در چهار سطح ظرفیت زراعی ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس اعمال گردید. پس از اعمال تیمارها برخی پارامترهای کمی و کیفی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد خشکی و شوری روی گیاه *آلوئه‌ورا* تأثیر منفی داشته و باعث کاهش عملکرد کل اندام هوایی، میزان ژل برگ و وزن تر و خشک ریشه شده است. نتایج نشان داد تنش بیشتر از ۴ دسی‌زیمنس بر متر و ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس روی عملکرد اثر گذاشته؛ ولی با افزایش تنش شوری و خشکی عملکرد اقتصادی این گیاه که شامل اندام هوایی و ژل موجود در گیاه است، کاهش داشته است؛ اگرچه روند کاهش بسیار کند بوده، به طوری که تا حد شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر و ۸۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس این گیاه عملکرد مناسبی را تولید کرده است.

واژگان کلیدی: شوری، خشکی، صبرزرد، ژل و عملکرد الوئه ورا.

** گروه زیست‌شناسی، مؤسسه آموزش عالی آل طه (نویسنده مسئول).

mh_plantbiology@yahoo.com

** گروه زیست‌شناسی، مؤسسه آموزش عالی آل طه (نویسنده مسئول).

mh_plantbiology@yahoo.com

مقدمه

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی در تولید ترکیبات مؤثره مورد نیاز جهت صنایع دارو سازی، لوازم آرایشی و بهداشتی و همچنین رویکرد مجدد دنیا به خصوص کشورهای پیشرفته به استفاده از داروهای گیاهی و سستی به جای داروهای شیمیایی، لزوم تحقیق بیشتر در مورد جنبه‌های مختلف تولید این گیاهان ارزشمند احساس می‌شود [۱].

گیاه صبرزرد یکی از گونه‌های بسیار مهم گیاهی می‌باشد که در نواحی گرم می‌روید [۲]. گیاه صبرزرد دارای خواص متعددی است و بی‌توجهی به امر کشت و توسعه این گیاه باعث حضور محصولات خارجی در بازارهای داخلی و منطقه خواهد شد؛ لذا با توجه به تقاضای بالای صنایع و درآمد مناسب حاصل از آن برنامه‌ریزی جهت معرفی و تولید این گیاه لازم و ضروری می‌باشد [۳]. صبرزرد گیاهی گوشتی، چندساله و روزت بوده، توان تولید پاجوش روی ریشه ضخیم خود را دارد. گیاه بالغ دارای ۱۲-۱۵ برگ ضخیم و گوشتی با کناره‌های خاردار است. برگ‌ها ضخیم و دارای پارانشیم بی‌رنگ، موسیلاژدار و شیره چسبنده است که این قسمت به عنوان بافت ذخیره‌کننده آب در گیاه محسوب می‌شود [۲].

از ژل برگ گیاه فراورده‌های زیادی در زمینه‌های دارویی، آرایشی، بهداشتی و غذایی تهیه می‌شود [۴]. آمار موجود در یک شرکت آمریکایی نشان می‌دهد بیش از ۱۳۰ نوع محصول مختلف از این گیاه تولید شده و صادرات عصاره این گیاه در سال ۱۹۹۱ بیش از ۲۸۰ میلیون دلار بوده است [۳].

گیاه آلوئه‌ورا محتوی ۷۵ ماده سازنده فعال شامل ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، مواد معدنی، قندها، لیگنین و آمینواسید می‌باشد [۵]. قندهای موجود در ژل آلوئه به دلیل فشار اسمزی بالا از رشد باکتری‌ها جلوگیری می‌کنند [۴]. خاصیت مرطوب‌کنندگی ژل به دلیل پلی‌ساکارید گلوکومانان است. خاصیت ترمیم زخم‌ها، تقویت سیستم ایمنی - خصوصاً فعالیت ضد میکروبی- و فعالیت ضد ویروسی ژل نیز ناشی از وجود

کربوهیدرات آسمانان می‌باشد. نقش ضد تورمی ژل به دلیل وجود ترکیبات برادیکینیناز و خاصیت ضد خارش پوست به دلیل وجود لاکتات منیزیم در ژل است [۱].

به طور کلی ژل موجود در برگ‌های آلوئه‌ورا دارای خواص و فعالیت‌های بیولوژیکی و فیزیولوژیکی متنوعی چون قابلیت ترمیم سوختگی‌های پوست و زخم‌ها، حفاظت از پوست در برابر اشعه‌های مضر، ضد ویروس ایدز و سرطان، ضد التهاب و تورم و بسیاری خواص دیگر است [۶].

افزایش عملکرد در واحد سطح و در واحد زمان یکی از اهداف اصلی کشاورزی نوین می‌باشد. برای نیل به این منظور مدیریت‌های کشاورزی برتر بسیار ضروری است [۷].

تنش یک عامل محیطی است که فرایند فیزیولوژیکی را مختل و در نتیجه تولید ماده را کاهش می‌دهد [۸]. در گیاهان زراعی علاوه بر شرایط محیطی نظیر گرما، سرما، کم‌آبی، رشد و میزان ماده خشک نیز می‌توانند به دلیل اثر اسمزی اصلاح و یا به دلیل مسمومیت ناشی از تجمع عناصر سدیم و کلر کاهش یابد [۹]. شوری خاک یا شوری آب آبیاری و خشکی از عمده‌ترین تنش‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک قلمداد می‌شوند [۸].

شوری از طریق اثر افزونی، متقابل یونی، اسمزی و تغذیه‌ای سبب تغییرات پیچیده‌ای در گیاه می‌شود که نتیجه آن، تغییرات آناتومیکی و فیزیولوژی گیاه به منظور اجتناب و یا سازگاری گیاه با آن عامل محیطی است [۹]. متناسب با شدت و نوع تنش در گیاه می‌توان با ترکیباتی مواجه شد که مقادیر و نوع این ترکیبات به عنوان شاخص تحمل تنش تغییر می‌کند (همان)؛ برای مثال افزایش قندها، پرولین، گلیسین بتائین [۸] اسید آبسیزیک [۹] و سایر محلول‌های آلی از این قبیل ترکیبات می‌باشند. این ترکیبات از طریق مشارکت در ایجاد تعادل اسمزی و حفظ فعالیت آنزیمی در حضور یون‌های سمی سبب افزایش مقاومت گیاه به شوری و خشکی می‌شوند [۹و۸].

در شرایط طبیعی گیاهان عالی خشکی‌زی در مناطق نزدیک ساحل دریا و اراضی شور با غلظت زیاد نمک مواجه‌اند. علاوه بر آن شوری ناشی از تجمع نمک بر اثر آبیاری بی‌رویه در مناطق خشک نیز وجود دارد. زمانی که کیفیت آب آبیاری پایین باشد (غلظت زیاد املاح) و زمانی که سیستم زهکشی مناسبی برای خارج نمودن نمک نباشد، تجمع نمک می‌تواند به سطحی از شوری برسد که برای گونه‌های حساس به شوری زیان‌آور باشد. غلظت زیاد Na^+ در خاک فقط به گیاهان صدمه نمی‌زند، بلکه سبب تخریب ساختمان خاک و کاهش خلل و فرج و نفوذپذیری آب در خاک می‌شود [۱۰]. مطالعات جدی درباره شرایط نامساعد محیطی و عکس‌العمل گیاهان نسبت به آنها از دهه اول قرن بیستم شروع شده است. خسارات تنش‌های کمبود آب، شوری و دما به گیاهان زراعی در سطح جهان در مقایسه با سایر تنش‌ها گسترده‌تر است و لذا تنش‌های شوری و خشکی بیشتر مورد توجه‌اند [۱۰ و ۱۱]. از آنجا که تا کنون اثرات توأم آنها بررسی نگردیده است، ضروری است در این زمینه تحقیقاتی انجام گردد.

۱. مواد و روش‌ها

۱-۱. زمان و محل انجام آزمایش

اوایل شهریور ۱۳۹۱ تعداد ۳۲۰ نشای آلوئه‌ورا توسط مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان تهیه گردید. گیاهان همه از اندازه مشابه بودند. بوته‌ها در زمان کاشت در مرحله چهار برگی قرار داشته‌اند. خاک موجود در گلدان آزمایش شامل رسی سیلتی، یک قسمت کود دامی پوسیده به نسبت دو به یک بود.

اندازه گلدانها دارای دهانه ۳۲ سانتی متر و ارتفاع حدود ۴۰ سانتی متر بود. نمونه‌ها پس از کشت به گلخانه بخش تحقیقات منابع طبیعی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی منتقل شدند. پس از یک ماه که گیاهان استقرار یافتند آبیاری با آب شور شروع و تا پایان طرح (۲۷۰ روز بعد از استقرار) ادامه یافت.

۱-۲. مشخصات خاک محل آزمایش

میزان عناصر معدنی خاک آزمایش از جمله $Ca+Mg$ ، HCO_3^- ، K^+ ، Na^+ ، Cl

، SO_4 ، مجموع کاتیون‌ها و آنیون‌ها و نیز pH آن در شهریور ماه، قبل از کاشت نشاء‌ها صورت پذیرفت که مقادیر آنها به قرار زیر بود.

جدول ۱-۲: خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مورد آزمایش

عناصر	Na	SO ₄	CL	HCO ₃	Ca+Mg	جمع هاکاتیون	جمع آنیون‌ها	PH	EC
درصد عناصر	۱۱۵	۳۳/۸	۱۷۰	۷/۲	۹۶	۲۱۱	۱۷۷/۲	۷/۵	۲۱/۳

خصوصیات فیزیکی خاک شامل جرم مخصوص ظاهری خاک با استفاده از حجم گلدان و میزان خاک موجود در آن پس از خشک کردن تا رسیدن به وزن ثابت و درصد حجمی سنگ ریزه با استفاده از وزن آن با فرض جرم مخصوص ظاهری سنگ ریزه‌ها به میزان ۲/۶۵ گرم بر سانتیمتر مکعب تعیین گردید. ظرفیت مزرعه و نقطه پژمردگی دائم توسط خاک عبور داده شده از الک ۲ میلیمتری و بترتیب در فشار یک سوم و ۱۵ بار تعیین شد و برای میزان سنگ ریزه تصحیح گردید. همچنین بافت خاک با استفاده از روش هیدرومتری تعیین گردید.

جدول ۲-۲- خصوصیات فیزیکی خاک گلدانهای مورد آزمایش

رطوبتی خاک در زمان آبیاری			درصد رطوبت حجمی در درصد تخلیه	رطوبت قابل دسترس	نقطه پژمردگی دائم	ظرفیت مزرعه	بافت خاک	رس	سیلت	شن	
۸۰٪	۶۰٪	۴۰٪	۰٪		(حجم آب/حجم خاک)					درصد	

۹/۲۱	۲۴/۴	۲۶/۹	۳۵	۱۲/۶	۲۲	۳۵	رسی - سیلتی	۴۰	۴۱	۱۹	۳۰
------	------	------	----	------	----	----	----------------	----	----	----	----

آزمایش به صورت اسپلیت پلات و در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی و در ۸ تکرار انجام گرفت. در این طرح فاکتور اول شامل تنش شوری با هدایت الکتریکی شاهد، ۴، ۸ و ۱۲ دسی زیمنس بر متر، فاکتور دوم شامل تنش خشکی شامل شاهد (ظرفیت زراعی مزرعه)، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درصد تخلیه آب قابل استفاده بود. که جهت تعیین زمان آبیاری رطوبت حجمی خاک با یک سنسور رطوبتی اندازه گیری گردید.

پس از ۱۵ ماه تیمار دهی در پایان دوره رشد در تیرماه ۱۳۹۳ پارامترهای رشد مانند، ضخامت برگهای خارجی و داخلی، طول و عرض برگ داخلی و خارجی، ارتفاع بوته، تعداد پاجوش، کلروفیل برگ، میزان ترکیبات فنلی در برگ، میزان پرولین و کربوهیدرات کل برگ، میزان ژل برگ، (هدایت الکتریکی ژا) ژل، اسیدپته ژل، عملکرد اندام هوایی، عملکرد ریشه و طول ریشه، عناصر سدیم، پتاسیم، کلسیم، آهن و روی اندازه گیری شد.

۲. اندازه گیری شاخص های کمی و کیفی

۲-۱. درصد ژل

در این مرحله شادابترین برگ هر بوته (برگ ۳ یا ۴) از هر نمونه جدا شده و برای اندازه گیری وزن تر به آزمایشگاه برده شد. پس از وزن کشی، با دقت فیله ژل را جدا و آن نیز وزن شد. سپس از فرمول زیر درصد ژل محاسبه شد.

$$\text{درصد ژل} = \left(\frac{\text{وزن ژل}}{\text{وزن تر برگ}} \right) \times 100$$

۲-۲. عملکرد ژل در هر بوته

کل محتوی ژل اندام هوایی استخراج شد و سپس وزن آن توسط ترازوی دیجیتالی اندازه گیری شد.

۲-۳. اسیدپته ژل

کل محتوی ژل اندام هوایی استخراج شد و پس از هموژنیزه شدن بوسیله همزن

برقی خانگی ژل یکنواخت شده از طریق دستگاه PH متر خوانده شد

۴-۲. هدایت الکتریکی ژل

کل محتوی ژل اندام هوایی را استخراج کرده و بوسیله ی همزن برقی خانگی هموژنیزه شد و ژل یکنواختی بدست آمد و با استفاده از دستگاه EC متر خوانده شد.

۵-۲. عملکرد اندام هوایی

اندام هوایی بوته از محل اتصال ساقه و ریشه جدا شد و سپس وزن آن توسط ترازوی دیجیتالی خوانده شد.

۶-۲. عملکرد ریشه

پس از جداسازی ریشه از اندام هوایی، وزن ریشه توسط ترازوی دیجیتالی خوانده شد.

۳. نتایج

۱-۳. عملکرد کل اندام هوایی

تجزیه واریانس عملکرد کل اندام هوایی نشان داد که سطوح مختلف شوری، سطوح مختلف خشکی و اثرات متقابل شوری و خشکی در سطح احتمال ۱ درصد بر روی این صفت اختلاف معناداری داشتند.

نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری بر روی عملکرد کل اندام هوایی نشان داد که بیشترین عملکرد (۱/۹۷ کیلوگرم در هر بوته) در شرایط عدم استفاده از تیمار شوری (شاهد) و کمترین میزان آن (۰/۸۷ کیلوگرم در هر بوته) در شرایط استفاده از تیمار ۱۲ دسی زیمنس در هر بوته حاصل شد.

بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه ی میانگین سطوح مختلف خشکی روی عملکرد کل اندام هوایی، دامنه ی تغییرات این صفت از ۰/۹۳ کیلوگرم در هر بوته در شرایط استفاده از تیمار ۸۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس تا ۱/۶۹ کیلوگرم در هر بوته در شرایط استفاده از تیمار ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس متغیر بود. ضمن اینکه بین تیمارهای ۴۰ و صفر درصد تخلیه آب قابل دسترس اختلاف معناداری وجود نداشت.

با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه ی میانگین اثرات مختلف شوری و خشکی بر روی عملکرد کل اندام هوایی، در شرایط استفاده از تیمارشاهد و ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس بیشترین میزان عملکرد (۲/۶۶ کیلوگرم در هر بوته) و در شرایط استفاده از تیمار ۱۲ دسی زیمنس بر متر و ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس کمترین میزان آن (۰/۶۴ کیلوگرم) حاصل شد. ضمن اینکه بین تیمارهای ۴۰-۰، ۰-۰ و ۴۰-۴۰ شوری و خشکی اختلاف معناداری مشاهده نشد.

۳-۲. وزن تر ریشه

تجزیه واریانس صفت وزن تر ریشه نشان داد که سطوح مختلف شوری، سطوح مختلف خشکی و اثرات متقابل شوری و خشکی در سطح احتمال ۱ درصد بر روی این صفت اختلاف معناداری داشتند.

نتایج مقایسه ی میانگین سطوح مختلف شوری بر روی وزن تر ریشه نشان داد که بیشترین میزان این صفت (۴۲/۶۹ گرم) متعلق به تیمارشوری شاهد و کمترین میزان آن (۲۸/۵ گرم) متعلق به تیمار شوری ۱۲ دسی زیمنس بر متر بود.

بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه ی میانگین سطوح مختلف خشکی روی وزن تر ریشه، دامنه ی تغییرات این صفت از ۲۷/۷۵ گرم در تیمار خشکی ۸۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس تا ۴۳/۹۵ گرم در تیمار ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس متغیر بود. ضمن اینکه بین تیمارهای ۴۰ و صفر درصد تخلیه آب قابل دسترس اختلاف معناداری مشاهده نشد.

با توجه به نتایج مقایسه ی میانگین اثرات متقابل شوری و خشکی بر روی وزن تر ریشه، بیشترین میزان این صفت (۶۳/۱۷ گرم) با اعمال تیمار ۴-۴۰ و کمترین میزان آن (۱۷/۰۰ گرم) با اعمال تیمار ۱۲-۸۰ حاصل شد.

۳-۳. وزن خشک ریشه

تجزیه واریانس وزن خشک ریشه نشان داد که سطوح مختلف شوری، سطوح مختلف خشکی و اثرات متقابل شوری و خشکی در سطح احتمال ۱ درصد بر روی این

صفت اختلاف معناداری داشتند.

نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف شوری روی میزان وزن خشک ریشه نشان داد که بیشترین میزان وزن خشک ریشه (۱۰/۴۱ گرم) در شرایط استفاده از تیمارشوری ۸ دسی زیمنس بر متر و کمترین میزان آن (۵/۹۷ گرم) در شرایط استفاده از تیمار شوری شاهد بدست آمده است.

بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه ی میانگین سطوح مختلف خشکی روی وزن خشک ریشه، دامنه ی تغییرات این صفت از ۶/۳۷ گرم در تیمار صفر درصد تخلیه آب قابل دسترس تا ۱۰/۵۰ گرم در تیمار ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس متغیر بود. بین تیمارهای ۸۰ و صفر درصد تخلیه آب قابل دسترس و همچنین بین تیمارهای ۴۰ و ۶۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس اختلاف معناداری مشاهده نشد.

با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه ی میانگین اثرات متقابل شوری و خشکی بر روی وزن خشک ریشه، اعمال تیمار شوری ۸ دسی زیمنس بر متر و خشکی ۶۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس باعث افزایش وزن خشک ریشه (۱۶/۰۷ گرم) و اعمال تیمار شوری شاهد و خشکی ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس باعث کاهش وزن خشک ریشه شد.

۳-۴. درصد رطوبت ژل

تجزیه واریانس درصد رطوبت ژل نشان داد که سطوح مختلف شوری، خشکی و اثرات متقابل شوری و خشکی بر روی این صفت در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار بودند.

مقایسه میانگین اثرات سطوح مختلف شوری روی صفت درصد رطوبت ژل برگ نشان داد که بیشترین درصد رطوبت ژل متعلق به تیمار شوری شاهد و کمترین آن متعلق به سطح شوری ۱۲ دسی زیمنس بر متر می باشد. همچنین نتایج نشان داد بین سطح شوری شاهد تا ۸ دسی زیمنس از لحاظ آماری تفاوت معناداری از لحاظ این

صفت مشاهد نمی شود.

بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه ی میانگین سطوح مختلف خشکی بر روی درصد رطوبت ژل، دامنه ی تغییرات این صفت از ۴۸/۷۶ درصد در شرایط استفاده از تیمار ۸۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس تا ۵۹/۱۳ درصد در شرایط استفاده از تیمار ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس متغیر بود.

با توجه به نتایج مقایسه ی میانگین اثرات متقابل شوری و خشکی بر روی درصد رطوبت ژل، اعمال تیمار ۴ دسی زیمنس بر متر و ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس باعث بیشترین میزان این صفت (۷۱/۷۷ درصد) و اعمال تیمار ۱۲ دسی زیمنس بر متر و ۸۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس باعث کمترین میزان (۴۰/۵۵ درصد) آن شده است.

۳-۵. درصد ژل برگ

نتایج تجزیه واریانس درصد ژل برگ نشان داد که سطوح مختلف خشکی روی این صفت در سطح ۱ درصد دارای اختلاف معناداری بود. سطوح مختلف شوری و اثرات متقابل شوری و خشکی روی این صفت اختلاف معناداری را نشان ندادند.

بر اساس نتایج مقایسه ی میانگین سطوح مختلف خشکی بر روی درصد ژل برگ، بیشترین میزان درصد ژل برگ (۵۹/۳۸ درصد) در شرایط استفاده از تیمار ۴۰ و کمترین میزان آن (۵۱/۳۵ درصد) در شرایط استفاده از تیمار ۸۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس حاصل شد. بین تیمارهای ۶۰، ۸۰ و صفر درصد تخلیه آب قابل دسترس اختلاف معناداری مشاهده نشد.

مقایسه میانگین اثرات متقابل این صفت نشان داد که درصد ژل برگ از ۴۸/۹۳ درصد در شوری ۱۲ دسی زیمنس بر متر و خشکی ۸۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس تا ۶۴/۲۹ درصد در شوری ۸ دسی زیمنس بر متر و خشکی ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس متفاوت بود.

۳-۶. میزان هدایت الکتریکی ژل

نتایج تجزیه واریانس میزان هدایت الکتریکی ژل نشان داد که سطوح مختلف

شوری و سطوح مختلف خشکی بر روی این صفت در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار می‌باشند. اثرات متقابل شوری و خشکی روی این صفت اختلاف معناداری را نشان نداند.

با توجه به مقایسه ی میانگین سطوح مختلف شوری بر روی میزان هدایت الکتریکی ژل نشان داد که بیشترین میزان این صفت (۱۱/۲۹ دسی زیمنس بر متر) در شرایط استفاده از شوری ۱۲ و کمترین میزان آن (۴/۰۶ دسی زیمنس بر متر) در شرایط عدم استفاده از شوری حاصل شد.

بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه ی میانگین سطوح مختلف خشکی بر روی ژل، دامنه ی تغییرات این صفت از ۶/۰۶ دسی زیمنس بر متر در شرایط استفاده از صفر درصد تخلیه آب قابل دسترس تا ۸/۶۳ دسی زیمنس بر متر در شرایط استفاده از ۸۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس متغیر بود. ضمن اینکه بین تیمارهای ۴۰ و صفر درصد تخلیه آب قابل دسترس اختلاف معناداری مشاهده نشد.

نتایج به دست آمده از مقایسه ی میانگین اثرات متقابل شوری و خشکی بر روی میزان هدایت الکتریکی ژل حاکی از این بود که اعمال شوری ۱۲ دسی زیمنس و خشکی ۸۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس باعث افزایش میزان هدایت الکتریکی ژل (۱۳/۲ دسی زیمنس بر متر) و اعمال شوری شاهد و خشکی ۶۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس باعث کاهش (۳/۷۵ دسی زیمنس بر متر) میزان هدایت الکتریکی ژل شد. بین تیمارهای ۴۰-۰ و ۶۰-۰ اختلاف معناداری مشاهده نشد.

۳-۷. اسیدیته ژل

نتایج تجزیه واریانس صفت اسیدیته ژل نشان داد که سطوح مختلف شوری بر روی این صفت در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود. اثرات متقابل شوری و خشکی و سطوح مختلف خشکی روی این صفت در سطح ۵ درصد اختلاف معناداری را نشان دادند.

با توجه به نتایج مقایسه ی سطوح مختلف شوری بر روی میزان اسیدیته ژل، بیشترین میزان اسیدیته ژل برابر با ۴/۸۹ با اعمال تیمار شوری ۸ دسی زیمنس و کمترین میزان آن (۴/۵۲) با اعمال تیمار شوری ۴ دسی زیمنس به دست آمده است. نتایج به دست آمده از سطوح مختلف خشکی روی اسیدیته ژل نشان داد که دامنه ی تغییرات این صفت از ۴/۶۲ با اعمال تیمار صفر درصد تخلیه آب قابل دسترس تا ۴/۷۵ با اعمال تیمار ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس متغیر بود. بین تیمارهای ۴۰ و ۶۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس اختلاف معناداری مشاهده نشد. نتایج به دست آمده از مقایسه ی میانگین اثرات متقابل شوری و خشکی روی اسیدیته ژل نشان داد که در تیمار ۸ دسی زیمنس بر متر و ۶۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس، بیشترین میزان اسیدیته ژل (۴/۹۸) و در تیمار ۴ دسی زیمنس و صفر درصد تخلیه آب قابل دسترس کمترین میزان آن را (۴/۲۶) را در پی داشت.

۳-۸. عملکرد ژل در هر بوته:

تجزیه واریانس عملکرد ژل در هر بوته نشان داد که سطوح مختلف شوری، سطوح مختلف خشکی و اثرات متقابل شوری و خشکی در سطح احتمال ۱ درصد بر روی این صفت اختلاف معناداری داشتند. نتایج مقایسه ی میانگین سطوح مختلف شوری بر روی عملکرد ژل در هر بوته نشان داد که بیشترین میزان عملکرد ژل (۱/۱۴ کیلوگرم در هر بوته) مربوط به تیمار شاهد و کمترین میزان آن (۰/۴۴ کیلوگرم در هر بوته) مربوط به تیمار ۱۲ دسی زیمنس بود. بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه ی میانگین سطوح مختلف خشکی روی عملکرد ژل در هر بوته، دامنه ی تغییرات این صفت از ۰/۴۸ کیلوگرم در هر بوته در شرایط استفاده از تیمار ۸۰ تا ۱/۰۱ کیلوگرم در هر بوته در شرایط استفاده از تیمار ۴۰ درصد تخلیه آب قابل دسترس متغیر بود.

با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه ی میانگین اثرات متقابل شوری و خشکی بر روی میزان عملکرد ژل در هر بوته با اعمال تیمار شاهد و صفر درصد تخلیه آب قابل

دسترس، بیشترین میزان عملکرد ژل در هر بوته برابر با ۱/۵۷ کیلوگرم در هر بوته حاصل و با اعمال تیمار ۱۲ دسی زیمنس بر متر و صفر درصد تخلیه آب قابل دسترس کمترین میزان آن برابر با ۰/۳۴ کیلوگرم در هر بوته حاصل شد. ضمن اینکه بین تیمارهای ۰-۴۰، ۰-۰ و ۴-۴۰ اختلاف معناداری مشاهده نشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج در این تحقیق نشان داد که خشکی و شوری روی گیاه الوئه را اثر منفی داشته و باعث کاهش عملکرد کل اندام هوایی، میزان ژل برگ و وزن تر و خشک ریشه شده است که این نتیجه با نتایج بسیاری از محققین همسو می باشد ولی نکته حائز اهمیت آن است که روند کاهش مانند بسیاری از گیاهان نبوده است. این گیاه با وجود توام خشکی و شوری در طی یکسال اعمال شوری همچنان به روند رشدی خود ادامه داده و عملکرد مطلوب و قابل توجهی داشته است.

تحقیقات متعدد نشان داده است که تنش های شوری و خشکی، تقسیم سلولی و رشد سلول ها را تحت تأثیر قرار داده که یکی از نتایج این تأثیرات کاهش مشخص در اندازه و تعداد برگ، کاهش تورژسانس سلولی و در نهایت کاهش رشد و توسعه سلول به خصوص در ساقه و برگها بوده است. با کاهش رشد سلول ها، اندازه اندام محدود و به همین دلیل اولین اثر محسوس تنش شوری و خشکی روی گیاه را می توان از روی کاهش ارتفاع یا اندازه کوچکتر گیاه تشخیص داد [۱۲]. در اثر توقف رشد برگ سطح فتوسنتزی کاهش یافته و این امر موجب کاهش سرعت رشد گیاه می گردد. کرامر [۱۳]، [۱۴] و [۱۵] در گزارش های متعدد خود به تأثیر سوء تنش خشکی و شوری در کاهش رشد و عملکرد گیاهان مختلف اشاره کرده اند که با نتایج این تحقیق همسو می باشد.

با افزایش تنش شوری و خشکی، فتوسنتز تا نقطه جبرانی کاهش می یابد. تنش های خشکی و شوری به طور مستقیم می تواند بر فرایندهای بیوشیمیایی مربوط به فتوسنتز اثر گذاشته و به طور غیر مستقیم ورود دی اکسید کربن به داخل روزنه ها، که به علت

تنش بسته شده‌اند را کاهش دهد. در این حالت هیدرات‌های کربن ساخته شده در گیاه تجمع می‌یابند و باعث کاهش فتوسنتز می‌گردند. در حالت تنش میزان هورمون سیتوکنین کاهش و بر میزان هورمون اسید ابسیزیک افزوده می‌شود که همه دلایل مطرح شده در کاهش رشد در گیاه خودش را نشان می‌دهد.

مقبلی (۲۰۱۲) در آزمایشی گزارش نمود که با افزایش شوری تعداد برگ، ارتفاع گیاه، تعداد پاجوش، وزن ریشه، وزن کل بوته، وزن برگ و وزن کل ژل کاهش یافت. پاسترناک و همکاران (۱۹۸۶) نشان دادند که ارتفاع گیاه، تعداد پاجوش، وزن برگ و وزن ژل در گونه‌های مختلف آلوئه ورا با افزایش سطح شوری کاهش می‌یابد. اشراقی (۱۳۹۲) گزارش نمود که ارتفاع گیاه، تعداد پاجوش، طول، عرض و قطر برگ، تعداد برگ، وزن ژل، درصد ژل، عملکرد بوته و اندام هوایی و عملکرد ریشه در سطح شوری ۳ دسی زیمنس بر متر به بیشترین مقدار و در سطح شوری ۹ دسی زیمنس بر متر به کمترین مقدار خود رسیده است [۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰].

نتایج این تحقیق همانند سایر تحقیقات ارائه شده توسط سایر دانشمندان در گیاهان مختلف بیانگر آن است که اثرات تنش خشکی و شوری روی اجزای مختلف گیاه متفاوت می‌باشد.

شوری و خشکی خاک به طور جدی شرایط محیط ریشه، پتانسیل اسمزی محلول خاک و موازنه طبیعی یونهای محلول را تغییر می‌دهند. موثرترین اثر شوری و خشکی روی گیاهان، کاهش رشد می‌باشد که با کاهش عملکرد همراه است. در این آزمایش هم با افزایش تنش خشکی در سطوح شوری ثابت و هم با افزایش تنش شوری در سطوح تنش خشکی ثابت روند عملکرد اندام هوایی گیاه و ژل کاهش نشان داده است. مقادیر پایین عملکرد اندام هوایی و ژل متعلق به سطوح شوری ۱۲ دسی زیمنس بر متر بوده ولی در این شوری بین سطوح مختلف خشکی تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده نمی‌گردد. علت این امر می‌تواند به خاطر مسمومیت ویژه یونها که اغلب با جذب زیاد کلرید سدیم و دیگر یونها و نامتعادل بودن تغذیه یا استرس ناشی از عدم تعادل یونها

می‌باشد مرتبط دانست. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که با افزایش شوری به طور معناداری بر میزان جذب سدیم و کلر در برگ و ریشه افزوده شده است.

منابع و مآخذ

۱. حمیداوغلی، ی.، ج. فتاحی مقدم و ر. فتوحی قزوینی؛ «ازدیاد درون شیشه‌ای گیاه دارویی آلونه (Alo ebrabadensis Mill)»؛ علوم کشاورزی ایران؛ ج ۳۶، ش ۴، ۱۳۸۴، ص ۹۰۳-۹۰۶.
۲. رضایی، م. ب.، گ. جایمند و و. مظفریان؛ شناخت گیاه صبر و ترکیب‌های دارویی و شیمیایی آن؛ تهران: مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، ۱۳۷۵.
۳. خلیج، م. ع. و ا. بیرامی‌زاده؛ «معرفی و توسعه کشت گیاه صبر زرد (Aloe Vera) در مناطق خشک»، دومین همایش گیاهان دارویی؛ تهران: دانشگاه شاهد، بهمن ۱۳۸۳.
۴. حقی، ق.؛ «تعیین مقدار کربوهیدرات‌ها در ژل برگ گیاه Aloe littoralis»، همایش ملی گیاهان دارویی ایران؛ تهران: مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، ۲۴ و ۲۶ بهمن، ۱۳۸۰.
5. Surjushe A., R.Vasani and D.G. Suple.; "Aloe vera : A short review", **Indian Journal of Dermatology**, 53, 2008, pp. 163-166.
۶. فتاحی مقدم، ج و ی. حمیداوغلی؛ «تولید و فرآوری گیاه دارویی صبرزرد (Aloe Vera)»، دومین همایش گیاهان دارویی؛ تهران: دانشگاه شاهد، بهمن ماه، ۱۳۸۳.
7. Ashraf, M. and Harris, P. J. C.; "Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plant", **Plant Science**, 166, 2004, p.3-16.
8. Ashraf, M., and Orooj, A.; "Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (Trachyspermum Ammi[L.] Sprague)", **J.Arid Environ**; 64 (2), 2006, pp.209-220
9. Abdollahi, M., Jafarpour M., Zeinali, H.; "Effects of various salicylic acid concentrations on growth of Aloe vera L", **International Journal of Agriscience**; 1 (5), 2011, pp.311-313.
10. Agarwal, S. and Pandey, V.; "Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in Cassia angustifolia", **Biologia Plantarum**, 48(4), 2004, pp. 555-560.

۱۱. باباییان، ن. م. و ض. تباراحمدی؛ رشد گیاه در اراضی شور و بایر؛ بابلسر: دانشگاه مازندران، بابلسر، ۱۳۸۱.
12. Boutraa T. and Sanders F.E.; "Effects of interactions of moisture regime and nutrient addition on nodulation and carbon partitioning in two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.)", **J Agron Crop Science**, 186, 2001, 229-232.
13. Kramer, P. J; **Water Relation of Plant**; Academic Press, 1983.
14. Levit, J.; **Responses of plants to environmental stress**, Vol. II, New York: Academic press, 1980.
15. Delgado, I. C. and Sanchez- raya . A. J.; "Effect of sodium chlorid and mineral nutrients on initial stages of development of sunflower life", **Comm. Soil. Sci. Plant Anal**, Vol. 38, No. 16/15, 2007, pp. 2013-2027.
16. Moghbeli, E., Fahollahi, S., Salari, H., Ahmadi, G., Salaghdar, F., Sfuri, A. and Hosseini grouh, M. S; "Effects of Salinity stress on ghorwth and yield of Aloe vera L", **Journal of medicinal plants Research**, 6(16), 2012, pp. 3272-3277.
17. Passarkli, M.; **Handbook of plant and crop stress**; Marcel Dekker Inc, 1999.
۱۸. اشراقی، ش؛ «بررسی اثر تنش شوری، اسیدسالیسیلیک و کود آهن بر صفات کمی و کیفی گیاه دارویی صبرزرد»، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم پایه و کشاورزی، ۱۳۹۲.
۱۹. باقری، ا. ع. نیکویی و ا. سلیمانی پور؛ «بررسی استفاده از نیروی کار در کشت گیاهان دارویی»، **مجموعه مقالات اولین همایش منطقه‌ای گیاهان دارویی، ادویه‌ای و معطر؛ شهرکرد: دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد، ۱۷ اردیبهشت ۱۳۸۵، ص ۱۱۶-۱۱۸.**
۲۰. بقایی، م، ح. علی اسدی، م. چیدری و ا. نوروزی؛ «نگاهی به اهمیت و چالش‌های پیش روی گیاهان دارویی در ایران»، **مجموعه مقالات اولین همایش منطقه‌ای گیاهان دارویی، ادویه‌ای و معطر؛ شهرکرد: دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد، ۱۷ اردیبهشت ۱۳۸۵.**

Evaluation of Hydrolysable Tannins, Polyphenolic Compounds and Antioxidant Effects of Hydroalcoholic Extract of *Aloe vera* L.

*A. Ghaderi

**H. Sabouri Fard

*** K. Ahmadi

****O. Abbaszadeh

*****A. Ghorbanzadeh

Abstract

Aloe vera gel and extract has many biological and physiological properties and is used in various pharmaceutical, food, cosmetic and health industries. In this study, in order to determine the amounts of total tannin, total phenol, total flavonoid and antioxidant of *Aloe vera* L. hydroalcoholic extract, an experiment was conducted in a completely randomized design with three replications in 2019. Methanolic extract was prepared from yellow aloe leaf gel. The amount of phenol and flavonoids was measured by spectrometry and the antioxidant activity of the gel extract was measured using DPHH free radical. This research was conducted in a greenhouse located in Dehshk village of Mashhad city, Khorasan Razavi province. Based on the results of determining the amount of secondary metabolites and antioxidant activity, the amount of total phenol in the hydroalcoholic extract of yellow *aloe vera* gel was 90.04 microg/g gallic acid per mg/ml dry weight of the gel, the total flavonoid content was 66.25 microV/g Quercetin per mg dry weight of the gel and total tannin content were 87.43µg/catechin g / mg dry weight of the gel.

**Ph.D. Student of Crop Physiology, Faculty of Agricultural Sciences, Shahid University. Tehran. Iran.

Hydroalcoholic gel extract of yellow *Aloe vera* gel with IC₅₀ index of 31.31 µg/ml has high antioxidant activity. The results of antioxidant activity in FRAP and BCB methods also confirmed the high potential of this plant in inhibiting oxidants. The correlation between the measured levels of antioxidant activity of extracts with other measured factors showed that the measurement of antioxidant activity in the three methods of DPPH, FRAP and BCB with the content of total phenol, total flavonoids and total tannins had a significant positive correlation. Results of this study showed that yellow *aloe vera* gel has high antioxidant activity and is also directly related to the amount of phenolic and flavonoid compounds.

Keywords: *Aloe vera*, Tannin, Antioxidant, Phenol, Flavonoid, DPPH.

استاندارد سازی مقادیر تانن‌های هیدرولیز شونده، ترکیبات پلی فنولیک و اثرات آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی ژل گیاه *Aloe vera L.* در روش‌های مختلف

*علی قادری

**حسین صبوری فرد

***خدیجه احمدی

****امید عباس‌زاده

****امیر قربان‌زاده

چکیده

ژل و عصاره گیاه دارویی صبرزرد (*Aloe vera L.*) دارای خواص متعدد بیولوژیک و فیزیولوژیک می‌باشد و در صنایع مختلف دارویی، غذایی و آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود. در این تحقیق به منظور تعیین مقادیر تانن کل، فنل کل، فلاونوئید کل و آنتی‌اکسیدان عصاره

* استادیار، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه فنی و حرفه‌ای، تهران، ایران (نویسنده مسئول).

Ghaderi885@yahoo.com

** دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران.

ایران.

*** دانشجوی دکتری گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیروان،

استان خراسان رضوی. ایران.

**** گروه علوم باغبانی - علوم و مهندسی باغبانی - گیاهان دارویی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع

طبیعی گرگان، گرگان. ایران.

**** گروه علوم باغبانی - علوم و مهندسی باغبانی - گیاهان دارویی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع

طبیعی گرگان، گرگان. ایران.

هیدروالکلی ژل صبرزرد، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۸ اجرا شد. این پژوهش در گلخانه‌ای واقع در روستای دهشک از توابع شهر مشهد استان خراسان رضوی انجام شد. از ژل‌برگ‌های صبرزرد عصاره متانولی تهیه شد. سنجش میزان فنل و فلاونوئید به روش اسپکترومتری صورت گرفت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ژل با استفاده از رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری شد. طبق نتایج به‌دست‌آمده از تعیین مقادیر متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مقدار فنل کل در عصاره هیدروالکلی ژل صبرزرد ۹۰/۰۴ میکرواکی والان گرم گالیک اسید بر میلی‌گرم وزن خشک ژل، مقدار فلاونوئید کل ۶۶/۲۵ میکرواکی والان گرم کوئرستین بر میلی‌گرم وزن خشک ژل و مقدار تانن کل، ۸۷/۴۳ میکرواکی والان گرم کاتشین بر میلی‌گرم وزن خشک ژل بود. عصاره ژل هیدروالکلی ژل صبرزرد با دارابودن شاخص IC_{50} معادل ۳۱/۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای فعالیت آنتی‌اکسیدان بالایی است. نتایج حاصل از فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش FRAP و BCB نیز مؤید پتانسیل بالای این گیاه در مهار اکسیدان‌ها بود. بررسی همبستگی بین مقادیر سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با دیگر فاکتورهای اندازه‌گیری‌شده نشان داد سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سه روش DPPH، FRAP و BCB با محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل همبستگی مثبت معناداری داشت. نتایج این مطالعه نشان داد ژل صبرزرد دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌باشد و همچنین با میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی رابطه مستقیم دارد.

واژه‌های کلیدی: *Aloe vera L.*، تانن، آنتی‌اکسیدان، فنل، فلاونوئید، DPPH.

مقدمه

جنس *Aloe* متعلق به خانواده *Liliaceae* است و یک گونه بومی ایران *Aloe littoralis* Baker دارد که معمولاً در مناطق جنوبی کشور از جمله استان هرمزگان و بوشهر می‌روید [۱]. گیاه دارویی *Aloe vera* با نام صبرزرد، صبرتلخ یا شاخ‌بزی که در استان بوشهر با نام‌های محلی گل سگله، گل قبر یا چادروا شناخته می‌شود، یکی از گونه‌های مهم دارویی است که در نواحی گرم و خشک از جمله سواحل جنوبی کشور می‌روید. در نوشته‌های کهن مصری آمده است که در ۱۵۰۰ سال قبل از میلاد مسیح از صبرزرد جهت رفع عفونت‌ها، ناراحتی‌های پوستی و به عنوان مسهل استفاده می‌کرده‌اند [۲]. گونه‌های دیگر از جمله *Aloe vera* L. (صبرزرد طبی) به ایران وارد شده است. این گیاهان در اصل بومی مناطق استوایی و جنوبی آفریقا، ماداگاسکار و عربستان هستند؛ ولی به نقاط دیگر دنیا نیز راه یافته‌اند. در ضمن تعدادی از گونه‌های زینتی آن به صورت وسیعی در اروپا و آمریکا برای استفاده از برگ آن و تزئین باغ‌ها، پارک‌ها و منازل کاشته می‌شوند. اکثر گونه‌های آن مصرف دارویی دارند [۳].

در حال حاضر محصولات مختلف صبرزرد در صنایع مختلف غذایی (انواع نوشابه‌ها، کمپوت، دوغ و...)، صنایع آرایشی و بهداشتی (انواع کرم‌ها، لوسیون‌ها، شامپوها، صابون‌ها، شوینده‌ها و...) و صنایع دارویی (کپسول، قرص جوشان و...) استفاده می‌شود [۴]. ژل یا عصاره گیاه به عنوان مسهل، ضد عفونی‌کننده معده، تقویت‌کننده دستگاه گوارش، تهیه پماد سوختگی - به دلیل خاصیت بازسازی سلول‌های از دست رفته بدن در زمان سوختگی، در درمان دیابت، رفع سوختگی بر اثر آفتاب‌زدگی و از جهت آرایشی، بهداشتی در تهیه کرم‌های نرم‌کننده، انواع شوینده‌های آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد [۵].

طبق آزمایش‌های فیتوشیمیایی صبرزرد، ژل صبرزرد سرشار از آلکالوئیدها، تانن‌ها، فلاونوئیدها، استرول‌ها، تریترپن‌ها، اوس‌ها، هولوزیدها، موسیلاژها و متابولیت‌های

کاهش‌دهنده ترکیبات است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی آزمایشگاهی نشان داد که عصاره تانن صبرزرد دارای فعالیت ضد رادیکالی می‌باشد [۶]. گیاه صبرزرد دارای اثرات دارویی زیادی مانند آنتی‌اکسیدان، محافظت از بیماری‌های گوارشی، ضد دیابت، محافظ قلب، محافظت از پوست، محافظت از استخوان، ضد سرطان، ضد میکروب، پری بیوتیک و محافظت از پوست است [۷]. این اثرات از ترکیبات فعال زیستی موجود در صبرزرد از جمله فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، تانن‌ها، استرول‌ها، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، آنتراکینون‌ها، ویتامین‌ها و مواد معدنی اعمال می‌شود [۸]. تحقیقات اخیر نشان داده است افزایش مصرف غذاهای سرشار از آنتی‌اکسیدان‌ها و پلی‌فنول‌ها مانند ویتامین C، بتاکاروتن، کوئرستین و کامفرول می‌تواند ایمنی بدن را در برابر عفونت‌های ویروسی افزایش دهد [۹].

ترکیبات فنلی فراوان‌ترین متابولیت‌های ثانویه در گیاهانند. ترکیبات فنلی گروه بزرگ و از نظر شیمیایی متنوعی‌اند که از اسیدهای فنلی ساده تا پلیمرهای بسیار بزرگ و پیچیده تانن‌ها و لیگنین‌ها و همچنین رنگدانه‌های فلاونوئید را شامل می‌شوند [۱۰]. فنل‌ها به دلیل توانایی مهار خود می‌توانند مستقیماً بر اثر آنتی‌اکسیداتیو دخیل باشند. مکانیسم عمل ترکیبات فنلی گیاه عمدتاً شامل فعالیت مهار رادیکال آزاد، خصوصیات کلات‌کنندگی فلز، توانایی تنظیم بیان ژن و نقش کوآنتی‌اکسیدانی است [۱۱]. استفاده از گیاهان دارویی در طب ایرانی قدمت بسیار طولانی دارد و امروزه استفاده از گیاهان دارویی به علت سازگاری بهتر با فیزیولوژیک بدن، داشتن عوارض جانبی کمتر در درمان بیماری‌های مختلف رو به افزایش است؛ از این رو با توجه به اهمیت این مسئله و به دلیل شناسایی سمیت در بسیاری از مواد آنتی‌اکسیدانی مصنوعی و محدودیت مصرف آنها، یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌ویژه از گیاهان و استفاده از آنها به‌خصوص در صنایع غذایی و دارویی بسیار مطلوب است. به علت شرایط اقلیمی کشورمان، در بیشتر مناطق، گونه‌های گیاهی مانند صبرزرد با خواص درمانی مهم انجام مطالعات گیاهی و شناخت مکانیسم عمل آنها ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از

این پژوهش تعیین مقادیر فنل کل، فلاونوئید کل، تانن کل عصاره ژل هیدروالکلی و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه دارویی صبرزرد سنجش شد.

(۱) مواد و روش‌ها

به منظور بررسی ارزیابی مقادیر تانن‌های هیدرولیز شونده و تغلیظ شده، ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و اثرات آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی ژل صبرزرد، به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۸ انجام گرفت. این پژوهش در گلخانه‌ای واقع در روستای دهشک از توابع مشهد، استان خراسان رضوی انجام شد. برگ‌های گیاه دارویی صبرزرد از گلخانه جمع‌آوری شد. برگ‌های دارای ظاهری سبزرنگ، گوشتی، با لبه‌های دندانه‌دار بودند. به منظور بالابردن شرایط بهداشتی در آزمایشگاه و عمل ضد عفونی ابتدا برگ‌ها با محلول کلرین ۲۵ درصد شسته و پس از خشک شدن برگ‌ها، مرحله استخراج ژل آغاز شد. قسمت بالایی نوک - که حاوی مقدار بسیار جزئی ژل است - و انتهای هر برگ بریده و کنار گذاشته شد. در ادامه پوسته خارجی برگ به وسیله تیغ استریل برش و جدا گردید و ژل میانی متصل به لایه زیرین موجود در برگ، مشخص گردید. سپس پالپ به همراه ژل موسیلاژ بی‌رنگ موجود در آن، توسط تیغ استریل و همچنین قاشق استریل، از پوسته زیرین که به آن متصل بود، جدا شد و با دستگاه سانتریفیوژ (۳۵۰۰ دور در دقیقه) ساخت شرکت Nikai ژاپن به صورت همگن و یکنواخت شد و برای جلوگیری از اکسیداسیون و فساد، بعد از توزین توسط ترازوی مدل Mattler ساخت کشور سوئد، در شیشه‌های تیره‌رنگ که قبلاً استریل و اتوکلاو شده بودند، ریخته و داخل یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد تا انجام آزمون‌ها نگهداری گردید [۱۲]. تمامی مواد شیمیایی و استانداردها از شرکت‌های مرک آلمان (Merck (Darmstadt, Germany)) و سیگما آمریکا ((Sigma (St. Louis, MO, USA)) تهیه شدند.

تهیه عصاره هیدروالکلی ژل صبر زرد: مقدار توزین شده‌ای از ژل صبرزرد موجود

در یخچال در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته و به آن متانول ۷۰ درصد اضافه گردید. در ارلن را با پارافیلیم پوشانده و به مدت ۲۴ ساعت به روی شیکر قرار داده شد. سپس با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شده و مجدداً متانول به آنها اضافه گردید. این عمل سه مرتبه تکرار شد. محلول ژل صاف‌شده به مدت ۷۲ ساعت در زیر هود آزمایشگاه قرار داده شد تا حذف حلال تا اندازه‌ای صورت گیرد. پس از گذشت این زمان برای تغلیظ و حذف بیشتر حلال از دستگاه فریز درایینگ مدل Heto ساخت کشور دانمارک استفاده گردید. سپس عصاره‌های خشک ژل صبرزد به ویال‌های شیشه‌ای که وزن آنها مشخص بود، منتقل و مجدداً وزن شد و تا هنگام تحقیقات بعدی در فریزر الکترواستیل ساخت ایران در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید [۱۲].

سنجش فنل کل: میزان فنل کل با روش فولین سیوکالتو تعیین شد. ابتدا با استفاده از اسیدگالیک به عنوان استاندارد یک منحنی کالیبراسیون رسم شد. غلظت‌های مختلف گالیک اسید در آب تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه (غلظت‌های مختلف اسید گالیک یا عصاره) به لوله آزمایش منتقل و توسط آب مقطر حجم آن به ۰/۵ میلی‌لیتر رسانده شد، سپس به ترتیب ۰/۲۵ میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالتو و ۱/۲۵ میلی‌لیتر سدیم کربنات ۲۰٪ به هر لوله افزوده شد. بعد از مخلوط کردن کامل محتویات لوله‌ها و بعد از گذشت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV/vis مدل Cecil ساخت کشور انگلستان اندازه‌گیری شد. میزان فنل کل هر نمونه با توجه به نمودار استاندارد بر حسب معادل گالیک اسید بیان گردید [۱۳].

سنجش فلاونوئید کل: میزان فلاونوئیدهای عصاره بر اساس تشکیل کمپلکس فلاونوئید-آلومینیم تعیین گردید. این کمپلکس دارای جذب ماکزیمم در طول موج ۴۳۰ نانومتر است. کوئرتستین برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. یک میلی‌لیتر از نمونه با یک میلی‌لیتر از محلول متانولی آلومینیوم کلراید ۲٪ مخلوط گردید و بعد از آنکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۳۰

نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. محتوای فلاونوئیدها بر حسب معادل کوئرستین (QE) بیان شد [۱۴]. اندازه‌گیری تانن کل (هیدرولیزشونده و تغلیظ‌شده): ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف کاتشین (یا محلول عصاره) با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول متانولی وانیلین ۰/۴٪ و ۰/۷۵ میلی‌لیتر HCl غلیظ مخلوط شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و جذب آن در طول موج ۵۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. محتوای تانن کل بر حسب معادل کاتشین (CE) بیان شد [۱۴]. آزمون‌های تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی: تعیین فعالیت مهار رادیکال DPPH: دو میلی-گرم از نمونه با یک میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۲ میلی‌مولار) مخلوط شد و این مخلوط به شدت تکان داده شد، سپس همه نمونه‌ها در دمای اتاق و تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. درصد رنگ‌بری محلول DPPH طبق رابطه ۱ محاسبه شد [۱۵].

$$\text{رابطه ۱:} \quad \text{درصد مهار} = \frac{B_0 - B_1 \times 100}{B_0}$$

B_1 = جذب مخلوط واکنش، B_0 = جذب محلول کنترل منفی، ویتامین C و BHT به عنوان کنترل مثبت.

روش احیاکنندگی فریک (FRAP): در این روش ویژگی الکترون‌دهندگی آنتی‌اکسیدان‌ها در pH پایین موجب احیای کاتیون فریک به فروس می‌شود. بنابراین قادرند کمپلکس بی‌رنگ فریک-تری‌پیریدیل-تریازین را به کمپلکس آبی‌رنگ فروس‌تری‌پیریدیل-تریازین تبدیل نمایند. به منظور تهیه محلول استوک ۳/۱ گرم استات سدیم و ۱۶ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال در یک لیتر آب مقطر حل شد و اسیدیته محلول در حدود ۳/۶ تنظیم شد (بافراستات) سپس ۳۱ میلی‌گرم 2,4,6-Tri(2-) TPTZ (pyridyl)-s-triazine در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۴۰ میلی‌مولار حل شد و به منظور تهیه محلول ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن، ۵/۴۱ گرم کلرید آهن در یک لیتر آب مقطر حل گردید. برای تهیه محلول استاندارد از سولفات آهن استفاده شد که ۰/۲۷۸ گرم سولفات

آهن در یک لیتر آب مقطر حل شد و در نهایت محلول‌های استاندارد ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار بر لیتر تهیه گردید. محلول نهایی FRAP با مخلوط کردن ۲۵ میلی لیتر بافر ۲/۵ میلی لیتر TPTZ و ۲/۵ میلی لیتر کلرید آهن آماده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کار داخل ظروف پیلت ریخته شد و به آن ۱۰ میکرولیتر از عصاره -که حاوی ۲/۵ میلی لیتر عصاره و ۶ میلی لیتر بافر فسفات بود- اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس میزان جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد و در نهایت با رسم منحنی کالیبراسیون میزان آنتی اکسیدان کل به دست آمد و بر اساس معادل میلی مول آهن در ۱۰۰ گرم وزن تر بیان گردید [۱۶].

روش رنگبری بتا-کاروتن- لینولئیک اسید (BCB): یک میلی لیتر از محلول بتاکاروتن (۰/۲ میلی گرم بر لیتر در کلروفرم) به دو میلی گرم لینولئیک اسید و ۱۰۰ میلی گرم توئین ۴۰ اضافه شد. برای تهیه امولسیون A، کلروفرم در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه تبخیر شد، سپس ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به محلول اضافه گردید و به مدت یک دقیقه در سونیکاتور در محلول حل شد. امولسیون دوم یا امولسیون B، شامل ۲۰ میلی گرم لینولئیک اسید، ۲۰۰ میلی گرم توئین ۴۰ و ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه است. ۲۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های عصاره یا BHT و Vit C به ۵ میلی لیتر امولسیون A در لوله‌های آزمایش اضافه شد. نمونه کنترل فاقد آنتی اکسیدان و شامل ۲۰۰ میلی لیتر متانول و پنج میلی لیتر امولسیون A بود. برای صفرکردن دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis، از ۲۰۰ میلی لیتر متانول و پنج میلی لیتر امولسیون B استفاده شد. جذب در زمان صفر و بعد از ۱۲۰ دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد مهار) نمونه‌ها طبق رابطه ۲ محاسبه شد:

$$\text{درصد مهار} = \frac{(AA(120) - AC(120))}{(AC(0) - AC(120))} \times 100$$

رابطه ۲:

$$t = 120 = \text{جذب آنتی اکسیدان در زمان } t = 0 = \text{جذب کنترل در زمان } t = 0 = AC(o)$$

هرچه قدرت ماده آنتی‌اکسیدان بیشتر باشد، رنگ‌بری بتاکاروتن کمتر است؛ یعنی هرچه رنگ بتاکاروتن بیشتر حفظ شود، جذب نمونه بالاتر و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر است. مواد آنتی‌اکسیدان Vit C و BHT نیز به عنوان کنترل مثبت به کار رفتند [۱۷].

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزارهای JMP 8 (SAS) Campus Drive, Cary, NC 27513 و Sigma Plot 12.0 استفاده شد. مقایسه میانگین با آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

کالیبراسیون فنل کل

میزان فنل کل موجود در عصاره هیدروالکلی ژل صبرزرد بر حسب اسیدگالیک که یک ترکیب فنلی خالص می‌باشد و به روش فولین سیوکالتو و از روی منحنی کالیبراسیون اسیدگالیک محاسبه شد. جذب‌های مربوط به غلظت‌های مختلف اسیدگالیک در طول موج ۷۲۵ نانومتر در جدول (۱) آمده است.

جدول ۱- جذب‌های مربوط به غلظت‌های مختلف اسیدگالیک در طول موج ۷۲۵ نانومتر

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶
غلظت محلول						
اسیدگالیک (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۵	۰	۰	۰	۸	۱
جذب در طول موج ۷۲۵ نانومتر	۰	۰/۴	۰/۵	۰/۳	۰/۲	۰/۰

۲) کالیبراسیون فلاونوئید کل

میزان فلاونوئیدهای موجود در عصاره هیدروالکلی ژل صبرزرد بر حسب فلاونوئید خالص کوئرستین و از روی منحنی کالیبراسیون آن محاسبه گردید. جذب‌های مربوط به

غلظت‌های مختلف کوئرسستین در طول موج ۴۳۰ نانومتر در جدول ۲ آمده است. بالاترین میزان جذب استاندارد (۱/۵) مربوط به بیشترین غلظت محلول کوئرسستین (۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود.

جدول ۲- جذب‌های مربوط به غلظت‌های مختلف کوئرسستین در طول موج ۴۳۰ نانومتر

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶
غلظت محلول کوئرسستین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۱۰	۲	۳۰	۵۰	۶	۸
جذب در طول موج ۴۳۰	۰/۲۲	۳	۴۱/	۶۰/	۷	۸
نانومتر	۰/۳	۰	۰	۰	۰/۰	۰/۵

۳) کالبراسیون تانن کل

میزان تانن‌های موجود در عصاره هیدروالکلی ژل صبرزد بر حسب کاتشین از روی منحنی کالبراسیون آن محاسبه می‌گردد. جذب‌های مربوط به غلظت‌های مختلف کاتشین در طول موج ۵۰۰ نانومتر در جدول ۳ آمده است. بر این اساس در بالاترین غلظت محلول استاندارد کاتشین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشترین جذب (۱/۲۰) مشاهده گردید.

جدول ۳- جذب‌های مربوط به غلظت‌های مختلف کاتشین در طول موج ۵۰۰ نانومتر

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
غلظت محلول کاتشین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
جذب در طول موج ۵۰۰ نانومتر	۰/۴	۰/۵	۰/۰	۰/۱	۰/۲	۰/۱	۰/۲	۰/۴

نتایج آزمون‌های فیتوشیمیایی: مقادیر فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل عصاره

هیدروالکلی ژل صبرزرد در جدول ۴ نشان داده شده است. بر این اساس، مقدار فنل کل در عصاره هیدروالکلی ژل صبرزرد ۹۰/۰۴ میکرواکی والان گرم اسیدگالیک بر میلی گرم وزن خشک ژل، مقدار فلاونوئید کل ۶۶/۲۵ میکرواکی والان گرم کوئرستین بر میلی گرم وزن خشک ژل و مقدار تانن کل، ۸۷/۴۳ میکرواکی والان گرم کاتشین بر میلی گرم وزن خشک ژل بود.

جدول ۴- مقادیر فنل کل، فلاونوئیدکل و تانن کل عصاره هیدروالکلی ژل صبرزرد

نمونه	فنل کل ^۱	فلاونوئید کل ^۲	تانن کل ^۳
عصاره هیدروالکلی ژل صبر زرد	۹۰/۰۴	۶۶/۲۵	۸۷/۴۳

۱. بر حسب میکرواکی والان گرم گالیک اسید بر میلی گرم وزن خشک ژل صبرزرد؛
 ۲. بر حسب میکرواکی والان گرم کوئرستین بر میلی گرم وزن خشک ژل صبرزرد؛
 ۳. بر حسب میکرواکی والان گرم کاتشین بر میلی گرم وزن خشک ژل صبرزرد.
تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی استانداردها: بر اساس نتایج حاصل، شاخص IC₅₀ در روش DPPH در VitC برابر ۷/۰۴ میکروگرم بر میلی لیتر بوده که پایین تر از استاندارد BHT می باشد (۸/۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر)؛ از این رو فعالیت آنتی اکسیدان VitC نسبت به استاندارد BHT بیشتر بود. در روش FRAP نیز فعالیت آنتی اکسیدان در استاندارد VitC بالاتر (۱۴/۳۰ میلی مولار بر گرم) از BHT (۱۲/۱۰ میلی مولار بر گرم) به دست آمد. فعالیت آنتی اکسیدان استاندارد VitC در روش بتاکاروتن لینولئیک اسید (BCB) نیز بیشتر (۱۹/۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر) از BHT (۱۵/۶۲ میکروگرم بر میلی لیتر) بود (جدول ۵).

جدول ۵- فعالیت آنتی اکسیدانی استانداردهای BHT و Vit C

نمونه	IC ₅₀ (DPPH)	(FRAP)	(BCB)
BHT	۸/۱۵	۱۲/۱۰	۱۵/۶۲

Vit C	۷/۰۴	۱۴/۳۰	۱۹/۴۰
-------	------	-------	-------

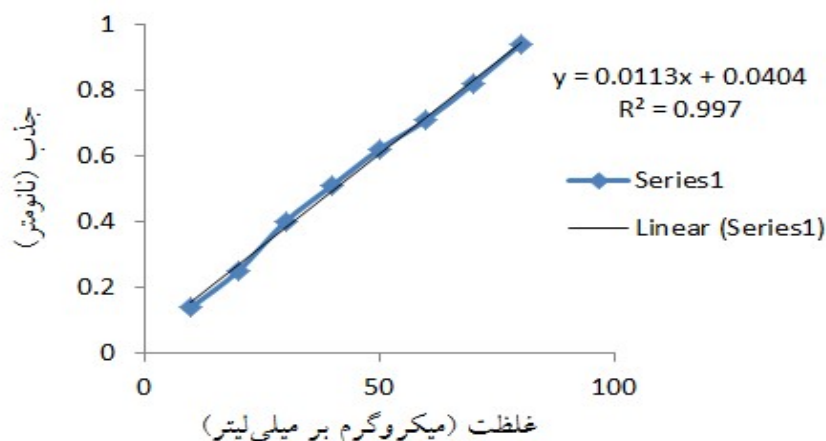
IC₅₀: میکروگرم بر میلی‌لیتر، FRAP: میلی‌مولار بر گرم، BCB: میکروگرم بر میلی‌لیتر، BHT: دی فنیل پیکریل هیدرازیل.

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: درصد بازداری نمونه را در روش DPPH (میکروگرم بر میلی‌لیتر) نشان می‌دهد. با افزایش غلظت، درصد بازداری عصاره در ژل افزایش یافت؛ به طوری که در بالاترین غلظت بازداری $98/01 \pm 2/03$ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در پایین‌ترین غلظت $9/50 \pm 0/10$ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

جدول ۶- بررسی درصد بازداری نمونه‌ها در روش DPPH (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

نمونه	۲/۵	۵	۱۰	۲۰
عصاره	$13/50 \pm 0/10$	$20/12 \pm 1/20$	$35/10 \pm 1/40$	$50/80 \pm 1/10$
نمونه	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
عصاره	$68/50 \pm 1/040$	$82/50 \pm 1/20$	$90/01 \pm 2/03$	$98/12 \pm 2/03$

منحنی رگرسیون خط درصد بازداری نمونه در روش DPPH در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از محاسبه IC₅₀ در روش DPPH بر اساس منحنی رگرسیون خط درصد بازداری، در جدول ۷ آمده است. هرچه درصد بازداری نمونه بیشتر باشد، شاخص IC₅₀ کمتر و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدان بالاتر است. بر اساس نتایج، شاخص IC₅₀ حاصل عصاره هیدروالکلی ژل صبرزرد برابر $31/31$ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

شکل ۴- منحنی تعیین IC_{50} جدول ۷- نتایج حاصل از محاسبه IC_{50} در روش DPPH

نمونه	IC_{50} (DPPH)
عصاره هیدروالکلی ژل صبر زرد	۳۱/۳۱

 IC_{50} : میکروگرم بر میلی لیتر

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی به روش FRAP: بر اساس یافته‌های جدول ۸ درصد بازداري عصاره هیدروالکلی ژل صبرزرد، وابسته به غلظت بود؛ به طوری که با افزایش غلظت، درصد بازداري نمونه از ۹/۲۲ به ۹۵/۱۳ میلی مولار بر گرم افزایش یافت.

جدول ۸- بررسی درصد بازداري نمونه‌ها در روش FRAP

نمونه	۲/۵	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
عصاره هیدروالکلی	±۰/۲	±۰/۴	±۰/۱	±۰/۳	±۰/۳	±۰/۲	±۰/۱
ژل صبر زرد	۹/۲	۱۴/	۲۳/	۴۰/	۵۸/	۷۷/۳	۹۵/

FRAP: میلی مولار بر گرم

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی به روش BCB: در این روش هم مطابق دو روش

قبل، درصد بازداری نمونه، وابسته به غلظت بود و با افزایش غلظت افزایش یافت؛ به طوری که درصد بازداری نمونه در پایین ترین غلظت ۵/۱۲ و در بالاترین غلظت ۸۹/۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود (جدول ۹).

جدول ۹- بررسی درصد بازداری نمونه ها در روش BCB

نمونه	۲/۵	۵	۱۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰
عصاره هیدروالکلی	۳±۰/۲	۲±۰/۱	۱±۰/۱	۵±۰/۳	۳±۰/۱	۲±۰/۱	۱±۰/۳
ژل صبرزرد	۵/	۱۰/	۱۶/	۴۱/	۵۶/	۶۸/	۸۹/

BCB: میکروگرم بر میلی لیتر

۴) بررسی همبستگی بین پارامترهای اندازه گیری شده

بررسی همبستگی بین مقادیر سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها با دیگر فاکتورهای اندازه گیری شده نشان می دهد سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی در سه روش DPPH، FRAP و BCB با محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل همبستگی مثبت معناداری در سطح ۵ درصد دارد ($R^2 = 0.985$).

جدول ۱۰- همبستگی بین پارامترهای مختلف اندازه گیری شده در عصاره

هیدروالکلی ژل صبر زرد

BCB	FRAP	DPPH	تانن کل	فلاونوئید کل	فنل کل	
۱	۰/۲۰۴ ^{ns}	۰/۱۳۶ ^{ns}	۰/۰۲۲*	۰/۰۱۰*	۰/۰۳۲*	BCB
	۱	۰/۱۱۲ ^{ns}	۰/۰۴۰*	۰/۰۳۱*	۰/۰۴۱*	FRAP
		۱	۰/۰۱۳*	۰/۰۴۲*	۰/۰۱۱*	DPPH
			۱	۰/۰۲۵*	۰/۰۳۰*	تانن کل
				۱	۰/۰۱۵*	فلاونوئید کل
					۱	فنل کل

^{ns} و * به ترتیب غیر معنادار و معنادار در سطح ۵ درصد معنادار

(۵) بحث

در پژوهش حاضر مقادیر ترکیبات فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل در عصاره هیدروالکلی ژل صبرزد بیانگر این بود که ژل این گیاه حاوی مقادیر بالایی از متابولیت‌های ثانویه است. هبستگی میان روش‌های مختلف اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی و مقادیر فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل، نتایج نشان داد جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد در عصاره هیدروالکلی ژل صبرزد با استفاده از روش DPPH همبستگی مثبت معناداری با محتوای هر سه ترکیب فوق داشته است. مفهوم این است که نقش ترکیبات پلی فنلی در فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH اساسی است. همچنین اندازه‌گیری خاصیت آنتی اکسیدانی از طریق مهار لینولئیک اسید (روش BCB)، نشان داد عصاره هیدروالکلی ژل صبرزد دارای توانایی بازدارندگی پراکسیداسیون لیپید می‌باشد. روش FRAP که فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها را بر اساس توانایی احیاکنندگی آهن می‌سنجد، درحقیقت تخمین خاصیت آنتی اکسیدانی ترکیبات قابل حل در آب را نشان می‌دهد. با توجه به ارتباط مثبت بین سنجش FRAP و محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل در این گیاه احتمالاً سطح بالای این ترکیبات در ژل برگ می‌تواند یک دلیل اصلی برای قدرت احیایی بالا در گیاه باشد. اکثر پلی فنل‌ها در بین ترکیبات فیتوشیمیایی آنتی اکسیدان به علت خصوصیت احیایی و عمل به دام انداختن رادیکال آزاد بسیار مهم‌اند. تعداد زیادی ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی در صبرزد مانند اسیدآسکوربیک، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، گلوکاتیون پراکسیداز، فنولیک‌ها، سوپراکسید دیسموتاز، تانن و ویتامین C و E. به طور مکانیکی به عنوان کاهش دهنده تنش اکسیداتیو، تخریب سلولی و همچنین کاهش فیزیولوژیکی و تغییرات بیوشیمیایی عمل می‌کند [۱۸].

در پژوهشی که توسط Radha و Laxmipriya (۲۰۱۵) صورت گرفت، رابطه خطی مثبتی میان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با فعالیت‌های بیولوژیکی مانند فعالیت

آنتی اکسیدانی، گزانتین اکسیداز (XO)، تیروزیناز، آنتی کلینسترز و فعالیت ضد التهابی در عصاره ژل صبرزرد گزارش شد که با نتایج حاصل از مطالعه ما نیز مطابقت داشت. Suhartati Djarkasi و همکاران (۲۰۲۱) دریافتند که ژل صبرزرد دارای غلظت‌های بالایی از ترکیبات فنلی مانند فلاوونوئیدها و اسیدهای ارگانیک‌اند. آنالیز متابولیکی این ترکیبات بیانگر ارزش بیش از حد آن در طب سنتی بود و توانسته منابعی از ترکیباتی را که دارای کاربردهای زیستی‌اند و در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند، شناسایی نماید که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مشابه بود. ویتامین C و آنتی اکسیدان‌های موجود در ژل صبرزرد ممکن است جایگزین مناسبی برای میان‌وعده‌ها در زمان همه‌گیری باشد؛ زیرا آنتی اکسیدان‌ها و ویتامین C می‌توانند ایمنی و پاسخ ضد التهابی را بهبود بخشند. همچنین پری‌بیوتیک‌های خوبی برای میکروبیوم روده است که نقش خوبی در سیستم ایمنی بدن ایفا می‌کند [۱۹]. طبق پژوهش Benzidia و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که صبرزرد سرشار از آلکالوئیدها، تانن‌ها، فلاوونوئیدها، استرول‌ها، تری‌ترپن‌ها، اوس‌ها، هولوسیدها، موسیلاژها و متابولیت‌های کاهش‌دهنده ترکیبات است؛ در حالی که ساپونین‌ها و کومارین‌ها وجود ندارد. نتیجه ترکیبات اصلی استخراج تانن‌های گیاه صبر زرد عبارت بودند از: اسید پالمیتیک (۱۱/۹۱ درصد)، فیتول (۱۴/۴۰ درصد)، اسیدلینولنیک (۱۶/۵۹ درصد) و دی‌یزوکتیل فتالات (۸۴/۱۱ درصد). فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد عصاره تانن گیاه صبر زرد فعالیت ضد رادیکالی متوسطی دارد.

دانشمندان معتقدند فعالیت آنتی اکسیدانی این مواد به علت فعالیت احیاکنندگی و جذب رادیکال‌های اکسیژن می‌باشد. بررسی‌های بیشتر در خصوص عصاره اتانولی ژل این گیاه نشان داد این عصاره، حاوی مولکول‌های کم‌وزن دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی‌اند. علاوه بر آن عصاره متانولی و عصاره آبی حاوی پلی‌ساکاریدهای گوناگونی‌اند که آنها نیز می‌توانند فعالیت آنتی اکسیدانی داشته باشند [۲۰]. در تحقیقات متعددی رابطه مستقیمی بین مقادیر فنل کل و فعالیت مهار رادیکال DPPH

وجود دارد. در مطالعه دیگری که جهت ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی صبرزرد صورت گرفت، نیز رابطه خطی میان میزان ترکیبات فنل کل موجود در عصاره‌ها و قدرت مهار رادیکال DPPH وجود داشت. در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها در روش DPPH وابسته به دوز بود و با افزایش غلظت، اثر مهارکنندگی بیشتری مشاهده شد [۲۱]. در مطالعه دیگری نیز که بر روی قدرت مهار رادیکال DPPH عصاره متانولی ژل صبرزرد انجام گرفت، عصاره مذکور دارای $23/76 \pm 0/80$ = IC₅₀ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که کاملاً قابل مقایسه با ترکیب آنتی‌اکسیدان BHT است [۲۲].

در تحقیق دیگری نیز که روی ژل گیاه صبرزرد انجام شد، رابطه مستقیمی بین محتوای فنلی عصاره و قدرت روبشگری رادیکال DPPH مشاهده گردید [۲۳]. در مطالعه‌ای که روی عصاره‌های مختلف ژل گیاه صبرزرد انجام شد، با افزایش قطبیت عصاره‌ها، محتوای فنلی و فلاونوئیدی عصاره‌ها و نیز قدرت مهار رادیکال DPPH افزایش می‌یابد؛ به طوری که بیشترین شاخص آنتی‌اکسیدان مربوط به عصاره هیدروالکلی ۵۰ درصد اتانول-آب با $14/48 \pm 0/02$ IC₅₀ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود [۲۴]. طبق مطالعه‌ای که Yebpella و همکاران (۲۰۱۱)، گیاه صبرزرد اثر آنتی‌اکسیدانی مطلوبی از خود نشان داده است که رابطه مستقیمی بین ترکیبات فنلی کل موجود در گیاه و اثر آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده است. همچنین در مطالعه دیگری که روی عصاره‌های مختلف گیاه ژل گیاه صبرزرد انجام شد، رابطه خطی میان محتوای ترکیبات فنلی عصاره‌های مختلف و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده گردید [۲۵].

Liu و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش کردند که استخراج تانن از عصاره متانولی ژل گیاه صبرزرد عملکرد بهتری نسبت به سایر حلال‌ها داشته است. نتایج حاصل نشان می‌دهند تانن‌ها به دلیل دارابودن حلقه‌های بنزنی در مولکول خود، نوعی ویژگی آبگریزی دارند؛ از این رو به نظر می‌رسد مناسب‌ترین حلال برای استخراج تانن‌ها، حلال‌هایی هستند که خاصیت آب‌دوستی دارند. در این میان و به منظور استخراج

حداکثری ترکیبات حاوی تانن، متانول و استون بالاترین بازده را در مقایسه با حلال‌های آبی دارا می‌باشند. نوع، میزان و درصد پلی‌فنل‌ها نشانه‌ای از کیفیت مطلوب گیاهان است. این ترکیبات نقش دفاع در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی، تأثیرگذار بر متابولیسم کربوهیدرات‌ها و همچنین نقش احتمالی در فتوسنتز را دارند. اثرات دارویی ژل گیاه صبرزرد به صورت عمده با میزان ترکیبات فنلی آنها در ارتباط است. میزان و نوع مواد مؤثره گیاهان دارویی با هدایت هر دو عامل ژنتیکی و محیطی مشخص می‌شود [۲۶]. Choi و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند که میزان پلی‌فنل‌ها برای عصاره اتانولی ژل صبرزرد ۱۰۰/۲۶ میکروگرم بر گرم وزن خشک ژل بود. در مطالعه‌ای که روی عصاره اتانولی ژل صبرزرد انجام شد، میزان تانن کل ۲۴۰ میکروگرم بر گرم وزن خشک ژل اندازه‌گیری شد [۲۷]. بنا بر نتایج مشاهده‌شده در این تحقیق و مقایسه آنها با نتایج حاصل از روش‌های دیگر مشخص می‌شود که ماهیت ترکیبات مورد بررسی و قدرت انحلال آنها در فازهای آبی و آلی با توجه به سیستم مورد استفاده، در نتایج به‌دست‌آمده در یک تحقیق آنتی‌اکسیدان اثر دارد و مطالعات دیگر نیز این مطلب را تأیید می‌کنند.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد عصاره ژل هیدروالکلی ژل صبرزرد با دارابودن شاخص IC_{50} معادل ۳۱/۳۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای فعالیت آنتی‌اکسیدان بالایی است. نتایج حاصل از فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش FRAP و BCB نیز مؤید پتانسیل بالای این گیاه در مهار اکسیدان‌ها بود. همچنین عصاره هیدروالکلی ژل صبرزرد به دلیل دارابودن مقادیر قابل ملاحظه‌ای از ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و تاننی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد. سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سه روش FRAP، DPPH و BCB با محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و تانن کل همبستگی مثبت معناداری داشت. درنتیجه با شناسایی و کاربرد بیشتر ترکیبات زیست فعال ژل صبرزرد می‌توان از هدررفتن مقادیر انبوهی آنتی‌اکسیدان طبیعی این گیاه مهم دارویی جلوگیری کرد.

Reference

1. Rechinger, K.H. 1982. *Lallemantia (Labiatae)* in Rechinger Flora Iranica No. 150: Akademische Druck-und Verlagsanstalt, Graz–Austria.
2. Yazdani D, Rezaei M, Kianbakht S and, Khosravani S. 2006. A Review on Different Aspects of *Aloe vera* L. Journal Med. Plants, 5(19):1-8
3. Nazeam JA, Gad HA, El-Hefnawy HM and Singab AB. 2017. Chromatographic separation and detection methods of *Aloe arborescens* Miller constituents: A systematic review. Journal of Chromatography and Analytical, 1058: 57–67.
4. Iqbal F and Ahmed A. 2021. Antibacterial activity of *Aloe barbadensis* Mill. Polish Journal of Environmental Studies, 30(4): 3637-3643.
5. Kumar S, Yadav M, Yadav A and Yadav JP. 2017. Impact of spatial and climatic conditions on phytochemical diversity and in vitro antioxidant activity of Indian *Aloe vera* (L.) S Afr J Botany. 111:50-59.
6. Benzidia B., Barbouchi M., Hammouch H., Belahbib N., Zouarhi M., Erramli H., Daoud, NA., Badrane N. and Hajjaji N.; "Chemical composition and antioxidant activity of tannins extract from green rind of *Aloe vera* (L.) Burm. F." 2019, Journal of King Saud University-Science, 31(4), pp.1175-1181.
7. Sánchez M, González-Burgos E, Iglesias I and Gómez-Serranillos MP. 2020. Pharmacological update properties of *Aloe vera* and its major active constituents. Molecules, 25(6): 1–37.
8. Marzanna H and Dziedzic K. 2019. Hęs 2019_Article_AloeVera L Web Natural Sources of A 1: 255–265.
9. Levy E, Delvin E, Marcil V and Spahis S. 2020. Can phytotherapy with polyphenols serve as a powerful approach for the prevention and therapy tool of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19)? American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 319(4): E689–E708.
10. Domingues Passero LF., Laurenti MD., Santos-Gomes G., Soares Campos BL., Sartorelli P., Lago G. and Henrique J.; "Plants used in traditional medicine: extracts and secondary

- metabolites exhibiting antileishmanial activity", 2014, Current Clinical Pharmacology; 9, pp.187–204.
11. Bauer G. and Zarkovic N.; "Revealing mechanisms of selective, concentration-dependent potentials of 4-hydroxy- 2-nonenal to induce apoptosis in cancer cells through inactivation of membrane-associated catalase", 2015, Free Radical of Biological Medicine; 81, pp.128–144.
 12. Kelly E. Heim, Anthony R. Tagliaferro, Dennis J. Bobilya; Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, 2002, Journal of Nutritional Biochemistry 13, 572–584.
 13. Yebpell GG, Adeyemi Hassan MM, Hammuel C, Magomya AM, Agbaji AS and Okonkwo EM. 2011. Phytochemical screening and comparative studies of antimicrobial activity of *Aloe vera* various extracts. African Journal of Microbiology Research, 5:1182-1187.
 14. Choi HC., Kim SJ., Son KY., Oh. BJ. and Cho BL.; "Metabolic effects of *Aloe vera* gel complex in obese prediabetes and early non-treated diabetic patients: Randomized controlled trial", 2013, Nutrition; 11, pp.22-29.
 15. Liu K, Park C, Li S, Lee KW, Liu H, He L, Soung NK, Ahn JS, Bode AM and Dong Z. 2012. Aloe-emodin suppresses prostate cancer by targeting the mTOR complex 2. Carcinogenesis, 33: 1406–1411.
 16. Arbaayah, H.H. and UmiKalsom, Y. Antioxidant Properties in the Oyster Mushrooms (*Pleurotus* spp.) and Split Gill Mushroom (*Schizophyllum commune*) Ethanolic Extracts. 2013, Mycosphere, 4, 661-673.
 17. Radha MH and Laxmipriya NP. 2015. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. Journal of Traditional Complementary Medicine, 5: 21–26.
 18. Iqbal H. 2012. Comparative efficacy of *Aloe vera* and *Tamarix aphylla* against cutaneous leishmaniasis. International Journal of Basic Medicine Science and Pharmacology, 2: 55-67.
 19. Suhartati Djarkasi GS, Lالujan LE, Sumual MF, Mayulu N and Nurkolis F. 2021. Antioxidant capacity of snack cookies made from *Mango* and *Aloe Vera* fermentation. Annals of the

- Romanian Society for Cell Biology, 25(6):6631–6635.
20. Rezaei B, Kamkar J and Mozafarian V. 1996. Knowledge of *Aloe vera* plant and its medicinal and chemical compounds. National Forests and Rangelands Research Institute, P: 29 - 14.
 21. Himesh S, Sarvesh S, Kaushelendra M, Singhai AK and Neelesh Ch. 2011. Qualitative and quantitative profile of aloin isolated from *Aloe vera*. International Research Journal of Pharmacy, 2: 121-122.
 22. Hazrati S, Tahmasebi Z and Babaei A. 2012. Enhancing yield and aloin concentration of *Aloe vera* plants by stimutaneous application of N and benzyladenine. Journal of Medicinal Plant Research, 6: 1834-1841.
 23. Fedorova M and Zarkovic N. 2017. Preface to the special issue on 4-hydroxynonenal and related lipid oxidation products. Free Radical of Biological Medicine, 111: 1-18.
 24. Shimpō K, Chihara T, Kaneko T, Beppu H, Wakamatsu K, Shinzato M, Yukitake J and Sonoda S. 2014. Inhibitory effects of low-dose aloe-emodin on the development of colorectal tumors in min mice. Journal of Cancer Prevention, 15: 5587–5592.
 25. Fallah H., Kianbakht S., Hajiaghache R., Afkhami AM., Bonakdaran A and Hashem, DF. 2012. *Aloe Vera* leaf jel in treatment of advanced type 2 diabetes mellitus needing insulin therapy: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. Journal of Medicinal Plants, 11: 19-27.
 26. Zarinpanjeh N, Oladzad Abbass Abadi A and Omid M. 2012. Effects of plant growth regulators and vitamin combinations on callus induction, somatic embryogenesis and plantlet production of *Aloe vera* L. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20: 181-191.
 27. Misawa E, Tanaka M, Nomaguchi K, Nabeshima K, Yamada M and Toida T. 2012. Oral ingestion of *Aloe Vera* phytosterols alters hepatic gene expression profiles and ameliorates obesity-associated metabolic disorders in Zucker diabetic fatty rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60: 799-806.
 - 28.

Table Contents

CRISPR-Based Diagnosis and Treatment of Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection/ Fatemeh Abdi Vazvani/
Fateme Akbarian

Apoptosis Induction of Colon Cancer Cells by Citrullus Colocynthis Extract/ Fatemeh Darabi/ Somayeh Arabzadeh/
Halimeh Hassanpour/ Azadeh Hekmat

Investigating the Effect and Function of Bacterial Toxins in the Treatment of Cance/ Fatemeh Tohidi/ Fatemeh Khoramshandi/
Hanie Najafi Delshad

Application of Plasmonic Biosensors to Detect Different Types of Viruses with Emphasis on COVID-19 Virus/ Saeideh Zaghian/
Sohameh Mohebbi/ Zahra Amini-bayat/ Neda Mousavi-Niri/
Mohammad Hossein Madad Elahi

Effect of Salinity and Drought Stress on some Quantitative and Qualitative Traits of Aloe Vera Medicinal Plant/ Hossein Zeinali/ Masoomeh Hasanbarani

Evaluation of Hydrolysable Tannins, Polyphenolic Compounds and Antioxidant Effects of Hydroalcoholic Extract of Aloe vera L./ A. Ghaderi/ H. Sabouri Fard/ K. Ahmadi/ O. Abbaszadeh/ A. Ghorbanzadeh

Biology: Principles to Concepts

The Quarterly Journal of
Department of Biology, Faculty of Basic Sciences
Vol.1/ issu.1/ Winter. 2023

Founder: Ale-Taha Higher Education Institute

General Manager: Dr. Fatemeh Akbarian

Editor in chief: Prof. Mahmood Akbarian

Editorial Board: Prof. Mahmood Akbarian, Prof. seyed Saeed Eshraghii, Prof. seyed Ali Haeri Rohani, Prof. Mohamad Hossein Sanati, Dr. Ghasem Ahangari, Dr. Ali Ghaderi, Dr. Fatemeh Akbarian, Dr. Somayeh Arabzadeh, Dr. Sohamah Mohebbi, Dr. Fatemeh Tohidi.

Specialized Secretary: Dr. Fatemeh Akbarian, Dr. Somayeh Arabzadeh, Dr. Sohamah Mohebbi, Dr. Fatemeh Tohidi.

Internal Manager: Dr. Fatemeh Tohidi

Editor: Ismaeil Ansari

Address: Tehran, Shahrn, Koohsar Blvd., after the fire department, Madrese St., Ale-Taha Institute of Higher Education, Journal Office.

Tel: +982144320647

Postal code: 1488836164/ **PO Box:** 144875-338