

## آنالیز بیوانفورماتیکی تأثیر Linalool تشنه‌داری (*Scrophularia striata*) بر پروتئین VacA هلیکوباکتر پیلوری

بهمن فاضلی نسب<sup>۱\*</sup>

۱) گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۱۷

### چکیده

**مقدمه:** برخی گیاهان از جمله تشنه‌داری، به‌طور سنتی در میان مردم زاگرس نشین، به‌عنوان التیام‌بخش عفونت و زخم استفاده می‌شده است. در تحقیقات پیشین، اثر التیام‌بخشی عصاره آبی و هیدروالکلی آن بر استرس اکسیداتیو و درمان زخم معده ناشی از اتانول در موش صحرایی تأیید شده است. بر اساس این، هدف از تحقیق حاضر، آنالیز بیوانفورماتیکی تأثیر Linalool (یکی از بیشترین اجزای تشنه‌داری) بر مهار پروتئین VacA هلیکوباکتر پیلوری است.

**مواد و روش‌ها:** توالی‌های DNA و پروتئینی Linalool گیاه آراییدوپسیس و توالی ژن VacA هلیکوباکتر پیلوری از سرچشمه NCBI تهیه شد. میزان هم‌ردیفی توالی‌های DNA و پروتئینی Linalool و VacA توسط نرم‌افزار Clustalw vol.2 بررسی و موتیف‌های حفاظت‌شده با استفاده از برنامه MEME جستجو گردید. درخت فیلوژنی به‌وسیله نرم‌افزار MEGA vol.5 ترسیم شد. برای تعیین ساختار سوم و همچنین داکینگ مولکولی بر اساس همولوژی، توسط نرم‌افزار Swiss-Model و ESYPred3D و همچنین Galaxy Web صورت گرفت.

**یافته‌های پژوهش:** پروتئین‌های لینالول گزارش شده در سرچشمه NCBI، در بیشتر گیاهان، سه موتیف حفاظت‌شده (در محدوده ۱۰۰ تا ۳۰۰ اسید آمینه) دارد. پروتئین VacA هر سه نوع دومین سیتوپلاسمی، غشایی و کینازی را داراست. بهترین الگوی داکینگ مولکولی بر اساس بیشترین اثر متقابل میان پروتئین لینالول و پروتئین VacA (۲۱/۰) و بیشترین دقت (۰/۱۳۳) انتخاب شد. نتایج نشان داد که در ساختار هر دو پروتئین لینالول و VacA، گروه‌های گوناگونی از جمله گروه‌های آلفاتیکی (چربی)، قطبی و آب‌دوست داشت. حضور چربی و آب‌دوست بودن در پروتئین VacA، به آن این قابلیت را می‌دهد که بتواند در صورت تجزیه نشدن، توسط سلولی‌های لنفوسیت، به‌راحتی از غشای سلول‌ها عبور کند و سبب بیماری‌زایی شود. از سویی، حضور همین گروه‌ها در لینالول نیز عاملی است که توانسته است پروتئین VacA را مهار کند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** آنالیز بیوانفورماتیکی نشان داد که لینالول سبب از میان بردن آثار هلیکوباکتر پیلوری می‌شود؛ همچنین نتایج پژوهش حاضر می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای برای تحقیقات آینده، برای ارزیابی تأثیر تک‌تک مواد مؤثر تشنه‌داری به‌ویژه لینالول، بر باکتری هلیکوباکتر پیلوری استفاده شوند.

**واژه‌های کلیدی:** داکینگ مولکولی، گل میمون سازویی، پروتئین VacA، سرطان معده

\* نویسنده مسئول: گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

Email: Bfazeli@uoz.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی، کند رشد، مارپیچی شکل و میکروآئروفیل است که به ایجاد طیف متنوعی از بیماری‌ها چون گاستریت ساده، زخم معده، التهاب معده، التهاب و زخم دوازدهه، لنفومای MALT و سرطان معده منجر می‌شود (۱). میزان عفونت ایجاد شده توسط هلیکوباکتر پیلوری در جهان، به‌طور میانگین در حدود ۵۰ درصد است. با این حال، میزان شیوع عفونت با این باکتری در کشورهای آسیایی، بالاتر و در حدود ۶۰ تا ۸۰ درصد است (۱، ۲). در ایران نیز عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری، تقریباً ۹۲-۸۲ درصد گزارش شده است (۲).

هلیکوباکتر پیلوری در میان باکتری‌های انتریک، بیشترین ناهمگونی ژنتیکی را نشان می‌دهد؛ علاوه بر این، بسیاری از سویه‌های این باکتری، از لحاظ محتوای ژنتیکی و توالی ژن‌های حفاظت‌شده، متنوع هستند؛ بنابراین، ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری به عوامل گوناگونی از قبیل شرایط محیطی، سطح بهداشت اجتماعی و نژاد افراد مبتلا و همچنین ویژگی‌های خود این ارگانیسم مانند حضور ژن‌های بیماری‌زای گوناگون از جمله *babA*، *homB*، *cagA*، *vacA*، *iceA*، *dupA* بستگی دارد (۳). در میان عوامل بیماری‌زا، *CagA* (یک سیتوتوکسین مرتبط با ژن *A*) و *VacA* (یک سیتوتوکسین واکوئله‌کننده *A*) در ۶۰-۷۰ درصد از سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری دیده شده است (۴). ژن *VacA* عامل مهم بیماری‌زای دیگری را کد می‌کند که سبب ایجاد واکوئل در سطح سلول‌های هسته‌دار (یوکاریوت) در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد (۵).

سه ژن *VacA*، *cagA* و *dupA* هلیکوباکتر پیلوری، در بیشتر بیماری‌های معده گزارش شده؛ اما ژن *VacA* به‌طور معناداری ( $P < 0.036$ ) در بیماری زخم معده نسبت به سایر ژن‌ها، بیشتر موجود بوده و نقش اصلی نیز در پیشرفت بیماری گاستروودونال داشته، در حالی که *dupA* با زخم اثناعشری در ارتباط بوده است (۶)؛ همچنین در پژوهشی، ژن‌های *VacA*، *cagA*، *cagT*، *cagE*، *hrgA*، *homB*، *babA* و *SabA* هلیکوباکتر پیلوری، به‌عنوان عامل گاستریت مزمن فعال، با بیماری زخم معده مرتبط دانسته‌اند (۷).

بر اساس تحقیقات گذشته، سویه‌های تولیدکننده ژن‌های بیماری‌زای *vacA* و *cagA* و *ureAB*، در بیماران با علائم کلینیکی مختلف مانند گاستریت، زخم معده، زخم دئودنوم و التهاب مری همراه با رفلکس، شیوع بیشتری دارند (۸).

در بعضی از تحقیقات نشان داده شده است که ژن‌های *CagA* و *VacA*، عوامل بیماری‌زای اصلی در پاتولوژی معده در افراد مبتلا به سرطان معده هستند (۸) و برخی دیگر، میان سرطان معده و هلیکوباکتر پیلوری ارتباطی پیدا نکرده‌اند (۶)؛ اما در مجموع، هلیکوباکتر پیلوری توسط انجمن بین‌المللی تحقیقات سرطان (International agency for research on cancer; IARC)، یکی از زیرمجموعه‌های سازمان جهانی بهداشت (WHO)، به‌عنوان عامل باکتریایی سرطان‌زای تیپ یک شناسایی شده است (۹). در میان عوامل بیماری‌زا، *CagA* و *VacA* در ۷۰-۶۰ درصد از سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری دیده شده‌اند (۴). چون پروتئین *VacA* پروتئین بزرگ‌تری نسبت به *cagA* است؛ پس احتمالاً دومین‌های بیشتر و کارکرد بیشتری نیز دارد؛ اما چون پروتئین *cagA* کوچک است؛ پس سلول باکتری زحمت کمتری برای ترشح متحمل می‌شود و این پروتئین به‌راحتی از غشا عبور می‌کند و توانایی حمله بیشتری دارد (۱۰). از سویی، در اشخاص بیمار، هر دو نوع پروتئین یافت شده‌اند. به نظر می‌رسد که پروتئین *cagA* که پروتئین کوچک‌تری است، در ابتدای آلودگی وارد عمل می‌شود و سپس پروتئین *VacA* عمل می‌کند و بیماری را گسترش می‌دهد و به سوی سرطانی شدن سوق خواهد داد و چون ژن *VacA* به‌طور معناداری در بیماری زخم معده، بیشتر از سایر ژن‌ها موجود است و نقش اصلی نیز در پیشرفت بیماری گاستروودونال، زخم و همچنین سرطان معده دارد (۶، ۷)؛ در نتیجه، ژن *VacA* برای این تحقیق انتخاب و در تحقیق بعدی نیز *cagA* بررسی خواهد شد.

درمان زخم معده با داروهای شیمیایی نظیر امپرازول، مترونیدازول، رانیتیدین و همراه با عوارض جانبی و بروز مشکلاتی نظیر پدیده خودایمی است و احتمال بازگشت ضایعات پس از قطع درمان، با آن‌ها وجود دارد؛

دی (۴/۷ درصد) مهم‌ترین ترکیب‌های عطرمایه را تشکیل می‌دهند(۱۸).

استفاده از تشنه‌داری به صورت گوناگونی از قبیل جوشانده خوراکی، بخور و ضماد، در درمان بیماری‌های متفاوت از جمله التهاب و عفونت چشم و گوش، سوختگی‌های پوستی، زخم‌های عفونی، اپی‌زیاتومی، درد و اختلالات گوارشی، سرماخوردگی، هموروئید، کورک، ضدعفونی مجاری اداری و گوارشی مؤثر است (۲۰، ۱۹)؛ همچنین عصارهٔ آبی و هیدروالکلی گیاه تشنه‌داری بر ترمیم زخم باز پوستی در خرگوش (۱۹)، بر روی رفتارهای اضطرابی و افسردگی در موش‌های سوری نر بالغ (۲۰)، استرس‌های اکسیداتیو ناشی از رفتارهای عصبی (۲۱)، ترمیم زخم سوختگی درجهٔ ۲ موش صحرایی (۲۲)، کاندیدا آلبیکانس (*Candida albicans*) در شرایط آزمایشگاهی (۲۳) و بر استرس اکسیداتیو و درمان زخم معدهٔ ناشی از اتانول در موش صحرایی (۱۵)، اثر التیام‌بخشی دارد. با توجه به اینکه تاکنون در هیچ پژوهشی، اثر تک‌تک مواد تشکیل‌دهندهٔ تشنه‌داری بر باکتری‌ها، به‌ویژه هلیکوباکتر پیلوری و نقش آن بر زخم و حتی سرطان معده بررسی نشده است؛ در نتیجه، در این تحقیق تلاش گردید با بررسی مهم‌ترین مواد تشکیل‌دهندهٔ عطرمایهٔ تشنه‌داری (۱۸)، مادهٔ فیتوشیمیایی Linalool با میزان ۱۸/۳ درصد، انتخاب و سپس آنالیز بیوانفورماتیکی آن را بر پروتئین VacA، مهم‌ترین عامل ایجادکنندهٔ زخم معده (هلیکوباکتر پیلوری) بررسی شود.

### مواد و روش‌ها

التیام‌بخشی عصارهٔ آبی و هیدروالکلی گیاه تشنه‌داری بر استرس اکسیداتیو و درمان زخم معدهٔ ناشی از اتانول در موش صحرایی: ابتدا تحقیقی در سال ۲۰۱۷، مبنی بر ارزیابی تأثیر عصارهٔ آبی (۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) و هیدروالکلی (۱۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) گیاه تشنه‌داری (جمع‌آوری شده از دامنهٔ رشته‌کوه زاگرس در استان ایلام) بر زخم معده (ایجادشده با ۴ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به‌صورت خوراکی و خورنده‌شده با استفاده از شمارگر(۲۴))، بر ۶۰ سر موش نر صحرایی

به همین علت، تلاش گسترده‌ای برای یافتن ترکیبات مؤثر طبیعی و گیاهی در درمان زخم معده وجود دارد (۱۱).

گیاهان دارویی منابع طبیعی ارزشمندی هستند که امروزه مورد توجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته‌اند و به‌عنوان مواد اولیه برای تبدیل به داروهای بی‌خطر برای انسان تلقی می‌شوند. در این زمینه، ایران یکی از غنی‌ترین منابع گیاهان دارویی جهان به شمار می‌رود که تنوع بالای شرایط زیستگاهی برای انواع این گیاهان را دارد (۱۲-۱۴).

گل میمون سازویی (*Scrophularia striata*) با نام محلی تشنه‌داری، گیاهی خودرو، چندساله و از تیرهٔ گل میمون است که در بیشتر مناطق معتدل و گرمسیری ایران از جمله ایلام و مناطقی از استان خوزستان، کرمانشاه، کردستان، لرستان، خراسان جنوبی، فارس، چهارمحال بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد یافت می‌شود (۱۵، ۱۶). با آنکه ترکیبات شیمیایی این گیاه، بیشتر شناسایی نشده بود؛ اما مردم ساکن استان ایلام سال‌هاست که به‌صورت تجربی، از این گیاه به صورت گوناگونی از قبیل جوشاندهٔ خوراکی، بخور و ضماد، در درمان بیماری‌های متفاوتی از جمله التهاب و عفونت چشم و گوش، سوختگی‌های پوستی، زخم‌های عفونی، اپی‌زیاتومی، درد و اختلالات گوارشی، سرماخوردگی، هموروئید، کورک و... استفاده می‌کنند(۱۵، ۱۶)؛ همچنین این گیاه، نه‌تنها اثر نیرومندی برای ضدعفونی مجاری اداری و گوارشی دارد، بلکه آثار متعددی از جمله تنظیم و کم کردن فشارخون و درمان افسردگی دارد. از سرشاخه‌های این گیاه، به‌عنوان تقویت‌کنندهٔ معده استفاده می‌شود.

در تیرهٔ گل میمون، ترکیباتی نظیر آلکالوئید، رزین گلیکوزید، ایریدوئید، کریپتوفیلیک‌اسید و فلاونوئیدها شناسایی شد (۱۷). در پژوهشی، از مواد تشکیل‌دهندهٔ موجود در عطرمایهٔ تشنه‌داری (*Scrophularia striata*) در مجموع، ۳۴ ترکیب شناسایی شد که ۹۰/۳ درصد کل عطرمایه را شامل می‌شوند. لینالول (۱۸/۳ درصد)، ۶، ۱۰، ۱۴ تری‌متیل پنتا دکان-۲-اون (۸/۴ درصد)، دی‌بوتیل فتالات (۶/۹ درصد)، بتا-داماکسون (۵/۹ درصد)، آلفا-تریپینول (۴/۹ درصد) و جرماکرن

vol.5 از توالی الاین (هم‌تراز) شده در Clustalw و روش Neighbor Joining ترسیم گردید.

برای تعیین ساختار سوم و همچنین داکینگ مولکولی بر اساس همولوژی، از نرم‌افزار Swiss-Model و ESYPred3D و همچنین Galaxy Web استفاده شد. برای تجسم این مدل از نرم‌افزار Weblab ViewerLite vol.4 و (<http://rasmol.org>) استفاده گردید. ارزیابی کیفیت استروکیمیکال ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها، به‌وسیله آنالیز PROCHECK (<http://wwwebi.ac.uk/pdbsum/procheck>) صورت گرفت و نمودار رامانچاندرا ن مربوط به ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها رسم شد.

در تحقیق حاضر هیچ نوع نمونه انسانی و حیوانی استفاده نشده است و همچنین کد اخلاق IR.UOZ.REC.1399.002 از دانشگاه زابل دارد.

#### یافته های پژوهش

نتایج التیام‌بخشی عصاره آبی و هیدروالکلی گیاه تشنه‌داری بر استرس اکسیداتیو و درمان زخم معده ناشی از اتانول در موش صحرایی نشان داد که SOD و MAD با افزایش سطوح تیمارهای مختلف عصاره، کمتر؛ اما TAC بیشتر شده است همچنین نتایج تشریح معده نیز نشان داد که عصاره آبی و هیدروالکلی، بر کاهش میزان و ابعاد زخم معده تأثیر مثبت داشته و سبب ترمیم زخم معده شده‌اند؛ اما میان آن‌ها اختلاف معناداری وجود نداشته است. هرچند، عصاره آبی توانسته است ابعاد زخم معده را نسبت به شاهد منفی ۹۰/۶۹ درصد و نسبت به شاهد مثبت ۶۶/۶۶ درصد کاهش دهد، عصاره هیدروالکلی نسبت به شاهد منفی ۸۶/۰۴ درصد و نسبت به شاهد مثبت ۵۰ درصد کاهش داده است؛ همچنین با افزایش میزان عصاره، تعداد و ابعاد زخم معده کمتر شده است (۱۵).

با توجه به اینکه حضور لینالول (۱۸/۳ درصد) در عطرمایه تشنه‌داری (*Scrophularia striata*) تأیید شده (۱۸)؛ اما هنوز توالی ژن و پروتئین آن مشخص نگردیده است؛ بنابراین، ابتدا سعی شد همه توالی‌های ارائه‌شده برای DNA و پروتئین این ژن از سرچایه NCBI تهیه و سپس از لحاظ شاخص dN/dS، مناطق

بالغ با محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم (تهیه‌شده از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان) انجام گردید (۱۵)؛ سپس خون‌گیری و آنالیز بیوشیمیایی TAC (ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام)، با استفاده از کیت TAC شرکت ZellBio آلمان (Zellbio GmbH, Deutschland) و نیز SOD (سوپراکسید دیسموتاز) و MDA (مالون‌دی‌آلدئید)، با استفاده از کیت TAC شرکت ZellBio آلمان (Zellbio GmbH, Deutschland)، بر روی موش‌های نر صحرایی بالغ صورت گرفت؛ سپس تشریح معده از لحاظ زخم و بهبودی بررسی شد (۲۵).

شناسایی توالی‌های ژن *Linalool* آرآبیدوپسیس و *VacA*: توالی‌های DNA و پروتئینی *Linalool* (فرمت Fasta) گیاه آرآبیدوپسیس (رشادی گوش موشی) (کد دسترسی: AF497485) و توالی ژن *VacA* (Vacuolating cytotoxin) باکتری *Helicobacter pylori* (کد دسترسی: AAB53868) از وب‌سایت (سراچه NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)) تهیه گردید.

آنالیز و بررسی بیوانفورماتیکی: از چندین نرم‌افزار آنالیز برای آنالیز توالی‌های DNA و پروتئینی *Linalool* رشادی گوش موشی و *VacA* باکتری *Helicobacter pylori* استفاده شد. آنالیز بیوانفورماتیکی و مقایسه‌های DNA و پروتئین *Linalool* و *VacA*، به‌صورت آنالیز، در سراچه‌های (<http://www.ncbi.nih.gov>) و Expasy (<http://expasy.org/tools>) انجام گردید.

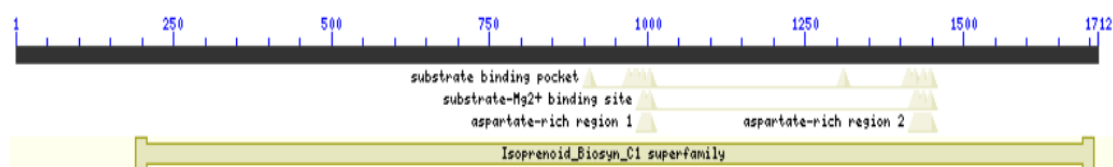
میزان هم‌ردیفی توالی‌های DNA و پروتئینی توسط نرم‌افزار Clustalw (<http://www.ebi.edu.au/tools/clustalw>)

بررسی شد. موتیف‌های حفاظت‌شده با استفاده از برنامه Multiple Em for Motif Elicitation (MEME vol.4.8) در سراچه (<http://meme.nbcr.net/meme/meme.html>) جستجو گردید (۲۶). پارامترهایی که در آنالیز MEME

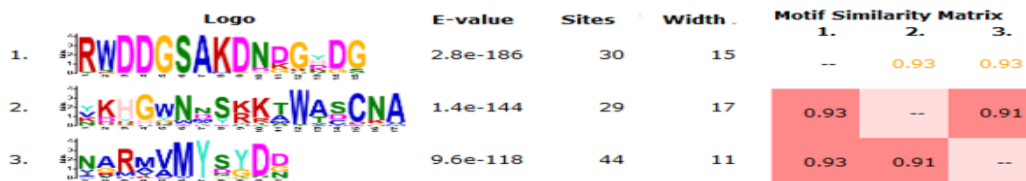
به کار گرفته شدند، عبارتند از: کمترین و بیشترین اندازه برای هر موتیف به ترتیب ۱۰۰ و ۳۰۰، بیشترین تعداد موتیف‌های جستجو شده ۳ و تعداد تکرار برای هر توالی ۱. درخت فیلوژنی به‌وسیله نرم‌افزار MEGA

دیگر، بیانگر نزدیکی توالی این ژن در میان سایر گونه‌هاست و بر اساس آنچه از dN/dS به دست آمد، می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات، در میان مناطق حفاظت‌شده یا همان موتیف‌ها و دومین‌ها اتفاق افتاده است؛ همچنین پروتئین‌های لینالول گزارش‌شده در سرچۀ NCBI در بیشتر گیاهان سه موتیف حفاظت‌شده (در محدوده ۱۰۰ تا ۳۰۰ اسید آمینه) دارد؛ بر اساس این، از پروتئین لینالول گیاه مدل یعنی رشادی گوش‌موشی، به‌عنوان مدلی از تشنه‌داری، برای این تحقیق استفاده شد.

حفاظت‌شده، موتیف‌ها و دومین‌ها بررسی شود (شکل‌های شماره ۱، ۲، ۳). سرانجام مشخص شد که مقدار عددی (dN/dS) برابر ۰/۷۸ است و چون این عدد کمتر از یک بود؛ در نتیجه نشان‌دهنده این است که انتخاب خالص بر ژن بررسی‌شده اتفاق افتاده و سبب تغییرات کلیدی نشده است. در نتایج تجزیه خوشه‌ای (شکل شماره ۴)، توالی‌های بیشتر گونه‌های گیاهی یکسان، در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند که نشان‌دهنده حفاظت توالی ژن لینالول در درون هر گونه است؛ همچنین قرار گرفتن برخی گیاهان در خوشه‌های



شکل شماره ۱. منطقه حفاظت‌شده در توالی DNA ژن لینالول در رشادی گوش‌موشی



شکل شماره ۲. تعداد، توالی، E-Value، تعداد اسید آمینه و ماتریکس شباهت موتیف‌های موجود در پروتئین linalool

Name	p-value	Motif Location
56. EF433762.1	2.36e-25	
58. AF154125.1	6.00e-8	
59. AF497485.1	1.25e-26	
60. NM_001319192.1	2.86e-19	
61. NM_001246876.3	9.73e-6	
63. HM807394.1	1.79e-33	
64. HM807395.1	1.78e-33	
65. HM807396.1	1.76e-33	
66. HM807397.1	1.73e-33	
69. JQ062931.1	2.25e-27	
70. NM_001281061.1	1.78e-33	

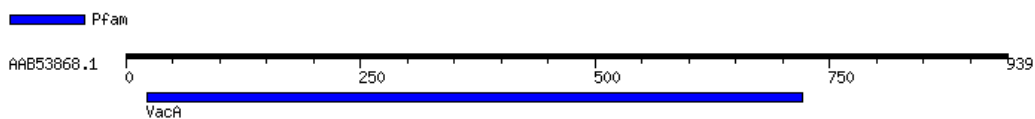
شکل شماره ۳. تعداد و موقعیت موتیف‌های موجود در پروتئین linalool



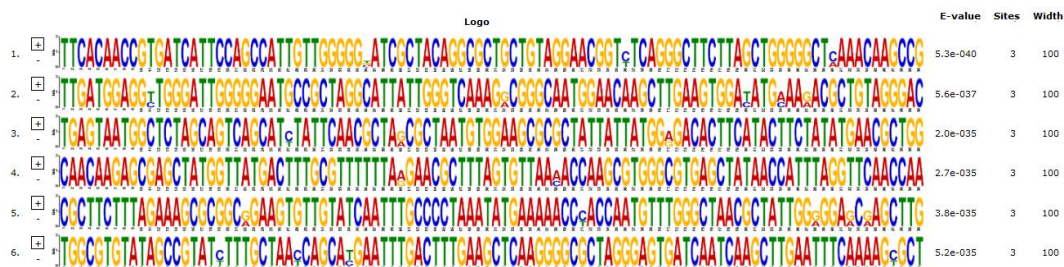
شکل شماره ۴. درخت فیلوژنی به‌دست‌آمده از همه توالی‌های DNA ژن لینالول گزارش شده در NCBI

داشته‌اند؛ در نتیجه، یکی از ژن VacA با کد دسترسی AAB53868، برای داکینگ مولکولی انتخاب گردید؛ همچنین بر اساس اینکه ژن‌های بیماری‌زا باکتریایی ترشحی هستند؛ پس بایستی دومین غشایی (شکل شماره ۹) و احتمالاً دومین‌های سیتوپلاسمی و کینازی نیز داشته باشند؛ بنابراین، برای صحت مراحل آزمایش و اطمینان بیشتر، این دومین‌ها، ارزیابی و مشخص شد که ژن VacA، هر سه نوع دومین مدنظر را دارد (شکل‌های شماره ۸، ۹، ۱۰).

با توجه به اینکه ژن VacA به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین ژن‌های بیماری‌زایی در باکتری هلیکوباکتر پیلوری شناخته شده است؛ بنابراین برای استفاده، ابتدا همه توالی‌های گزارش شده در NCBI تهیه و سپس باهم ارزیابی گردید و مناطق حفاظت‌شده، موتیف‌ها و دومین‌های آن بررسی و بر اساس موتیف‌های ۶ تا ۱۰ اسید آمینه‌ای مشخص شد که ۶ موتیف داشت (شکل‌های شماره ۵، ۶، ۷) و با توجه به اینکه همه توالی‌ها، موتیف‌های یکسان و حفاظت‌شده‌ای



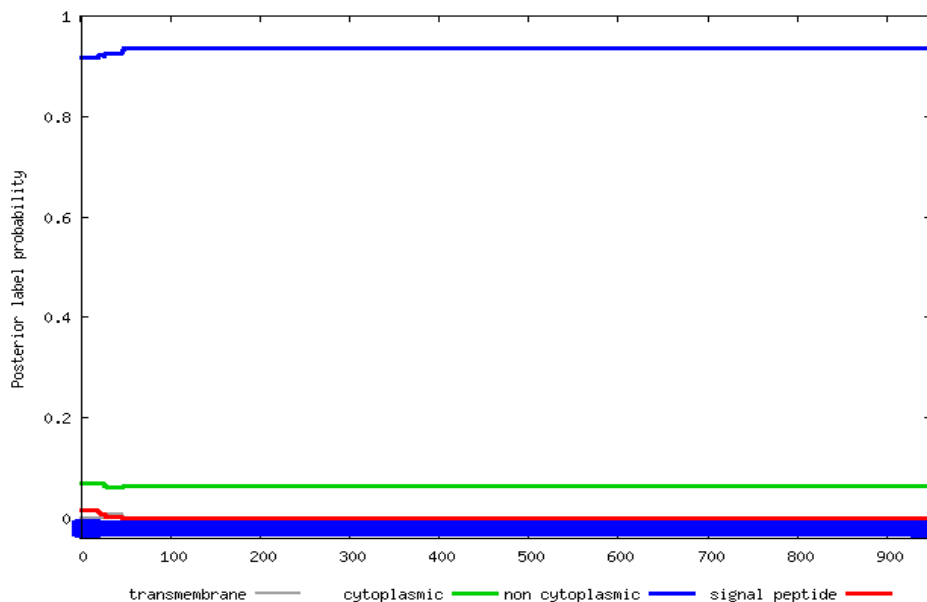
شکل شماره ۵. منطقه حفاظت‌شده در توالی پروتئین ژن VacA در باکتری هلیکوباکتر پیلوری



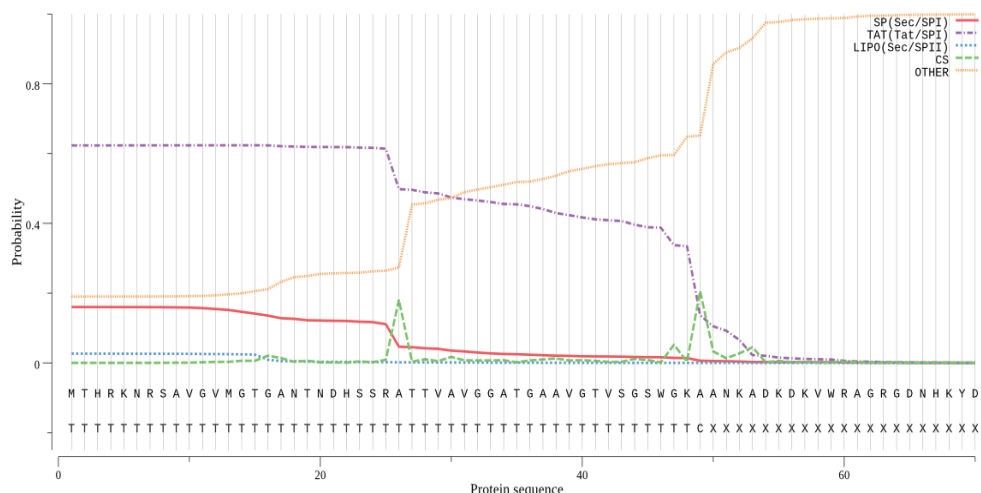
شکل شماره ۶. توالی و E-Value موتیف‌های موجود در توالی‌های ژن VacA هلیکوباکتر پیلوری گزارش شده در NCBI



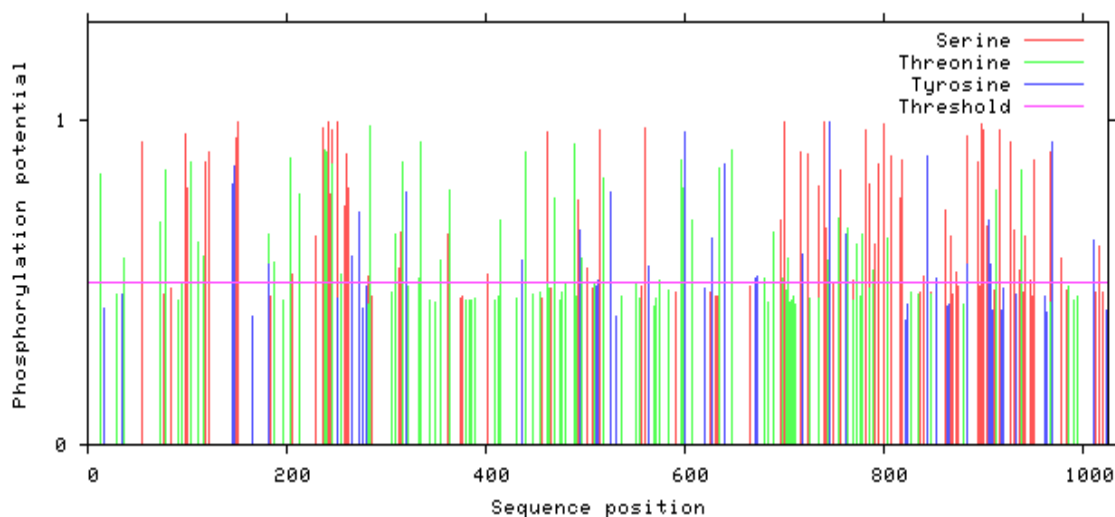
شکل شماره ۷. موقعیت موتیف‌های موجود در توالی‌های ژن VacA هلیکوباکتر پیلوری گزارش شده در NCBI



شکل شماره ۸. دومین غشایی، کینازی و سیتوپلاسمی موجود در پروتئین VacA (کد دسترسی: AAA86834)



شکل شماره ۹. انواع دومین‌های غشایی موجود در پروتئین VacA (کد دسترسی: AAA86834)

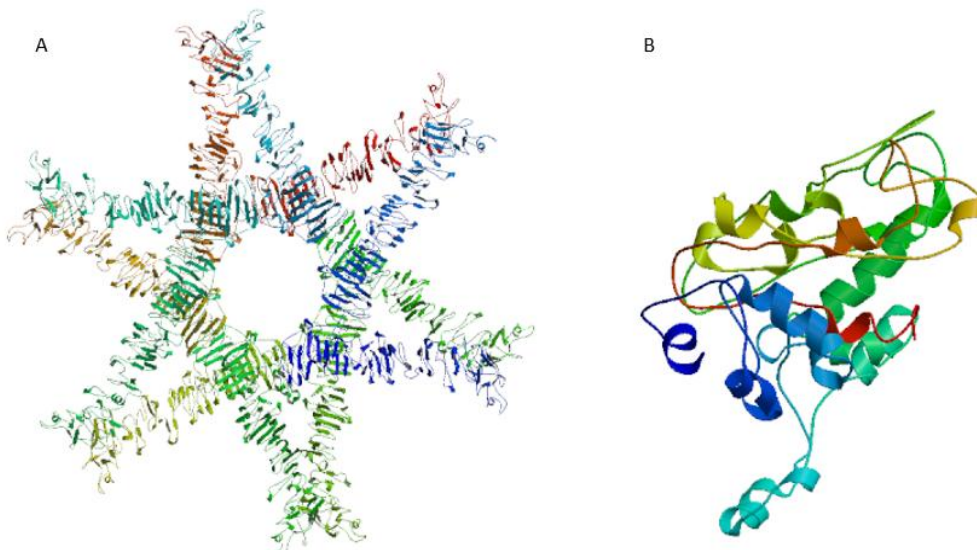


شکل شماره ۱۰. انواع دومین‌های کینازی موجود در پروتئین VacA (کد دسترسی: AAA86834)

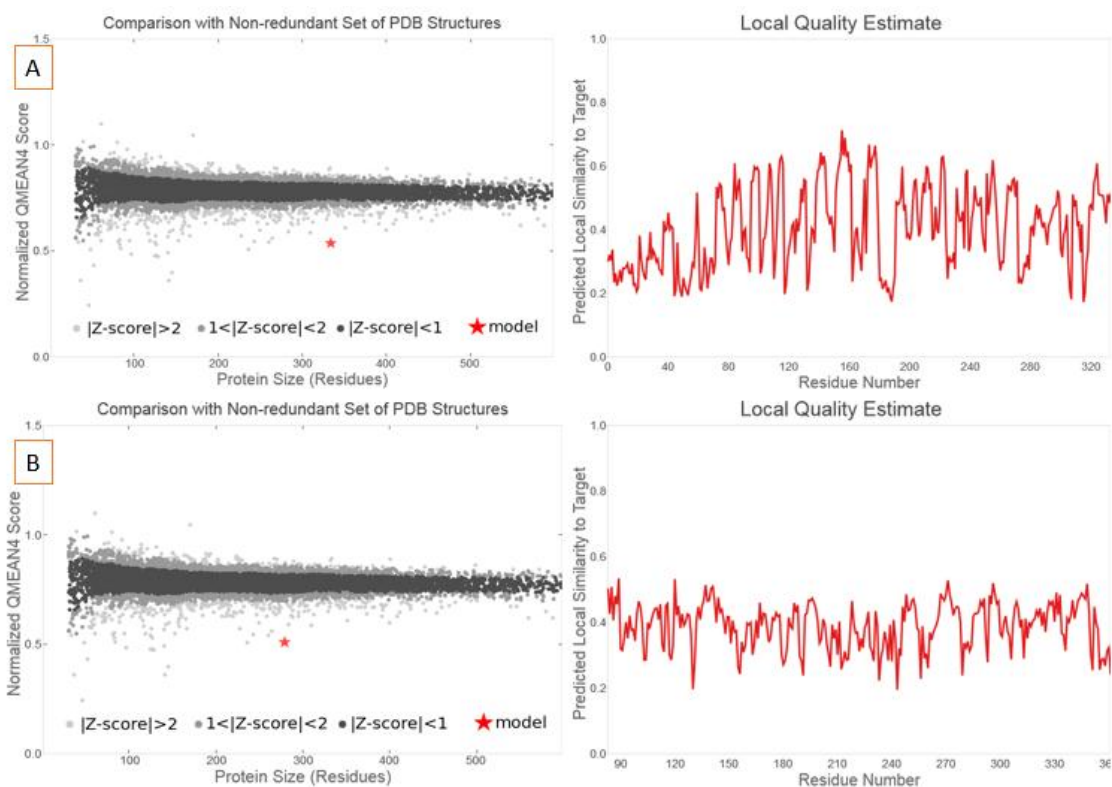
گردید (جدول شماره ۱؛ شکل شماره ۱۳). گفتنی است که در ساختار هر دو پروتئین لینالول و VacA، گروه‌های مختلفی از جمله گروه‌های آلیفاتیک (چربی)، قطبی و آب‌دوست موجود بود (شکل شماره ۱۴) که حضور چربی و آب‌دوست بودن در پروتئین VacA، به آن این قابلیت را داده است که بتواند در صورت تجزیه نشدن توسط سلول‌های لنفوسیت، به راحتی از غشای سلول‌ها عبور کند و سبب بیماری‌زایی شود؛ به همین علت است که مهم‌ترین ژن بیماری‌زایی هلیکوباکتر پیلوری است و علاوه بر زخم معده، باعث سرطان معده نیز خواهد شد.

برای تأثیر احتمالی پروتئین لینالول بر پروتئین VacA، ابتدا ساختار سوم پروتئین لینالول (شکل شماره ۱۱B) و VacA (شکل شماره ۱۱A)، به همراه کیفیت ساختار سوم پیش‌بینی (شکل شماره ۱۲) و سپس مناطق حفاظت‌شده و موتیف‌ها، شناسایی و در نهایت، بخشی از منطقه حفاظت‌شده پروتئین لینالول بر بخشی کلیدی از پروتئین VacA داکینگ مولکولی شد و بر اساس اینکه لینالول بر VacA واکنش نشان خواهد داد و به آن پیوند و مانع فعالیت آن خواهد شد؛ الگوهایی پیش‌بینی شده بود که سرانجام، بهترین الگو بر اساس بیشترین اثر متقابل میان پروتئین لینالول و پروتئین VacA (۲۱/۰) و بیشترین دقت (۰/۱۳۳) انتخاب

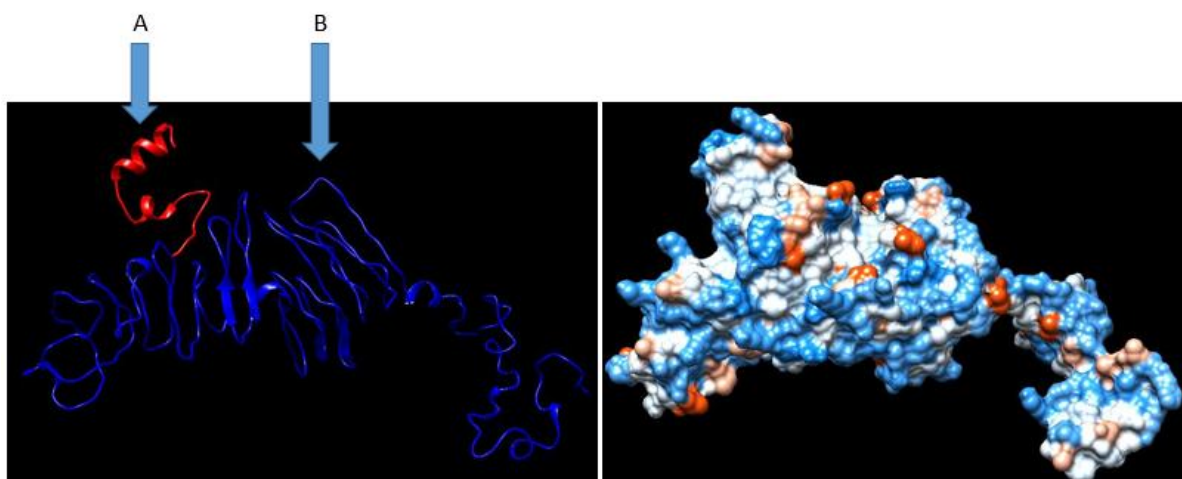




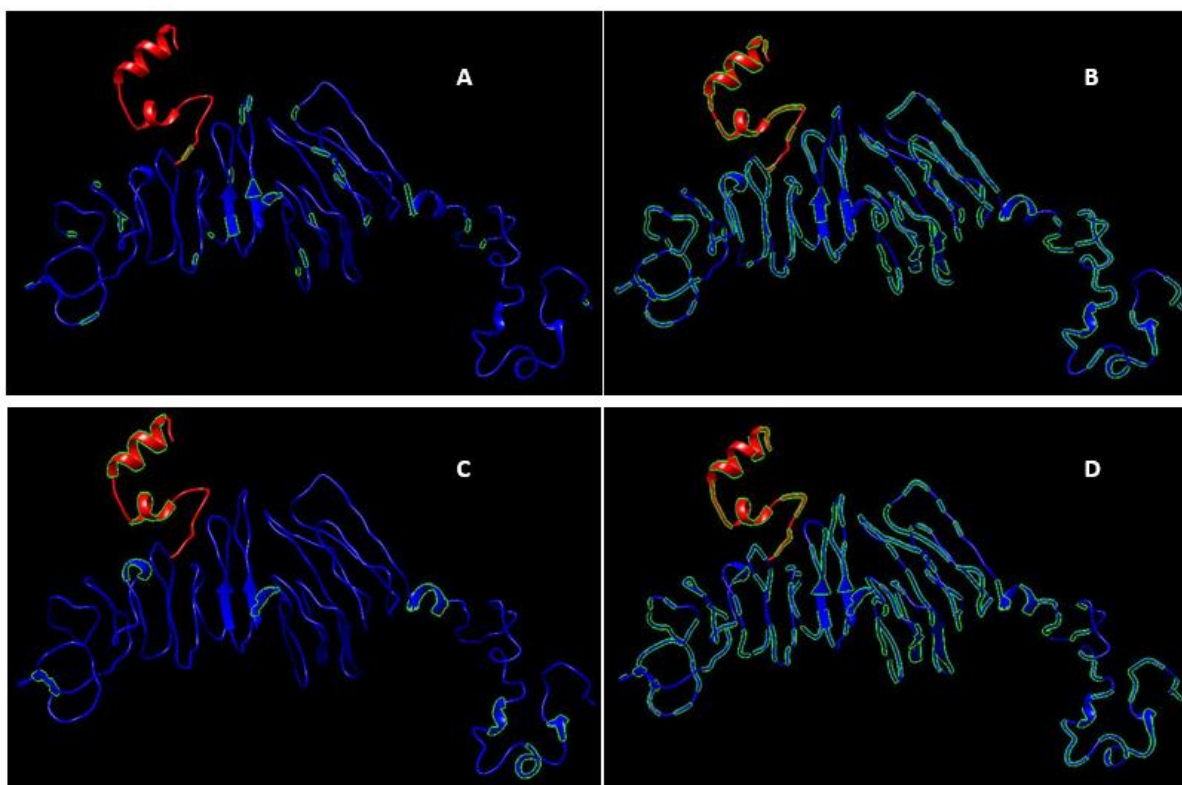
شکل شماره ۱۱. ساختار سوم پروتئین لینالول رشادی گوش موشی (B) و VacA هلیکوباکتر پیلوری (A)



شکل شماره ۱۲. نمودارهای کیفیت الگوی ساخته شده ساختار سوم پروتئین لینالول (A) و پروتئین VacA (B)



شکل شماره ۱۳. نتیجه داکینگ مولکولی پروتئین لینالول رشادی گوش موشی (سمت چپ قسمت A) بر پروتئین VacA هلیکوباکتر پیلوری (سمت چپ قسمت B) و ساختار سه بعدی پروتئین نهایی (سمت راست)



شکل شماره ۱۴. موقعیت گروه‌های مختلف آلفاتیک (A)، قطبی (B)، آب‌دوست (D) و ساختار آلفا هلیکس (C) در الگوی نهایی به‌دست‌آمده از ترکیب لینالول و VacA

جدول شماره ۱. انواع الگوهای بیش‌بینی شده برای داکینگ مولکولی میان لینالول و ژن VacA

Model	Protein template	Peptide template	Protein structure similarity (TM-score)	Interaction similarity score	Estimated accuracy
1	3A79_A	3A79_C	0.450	21.0	0.133
2	3TWR_D	3TWR_E	0.446	7.0	0.098
3	3TWT_B	3TWT_E	0.458	-9.0	0.075
4	3AX3_G	3AX3_B	0.453	-3.0	0.083
5	3A79_B	3A79_C	0.448	3.0	0.091
6	3TWX_B	3TWX_C	0.444	7.0	0.096
7	3TWW_A	3TWW_C	0.458	-13.0	0.066
8	3TWS_D	3TWS_E	0.441	6.0	0.091
9	3TWW_B	3TWW_C	0.437	7.0	0.090
10	3TWS_A	3TWS_E	0.447	-7.0	0.067

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تغییرات نوکلئوتیدی که سبب تغییر اسید آمینه شده‌اند (dN)، نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینه حاصل نداشته‌اند (dS)، یک روش کارآمد برای تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها است (۲۷). اگر این نسبت از یک بیشتر باشد، انتخاب مثبت، اگر کمتر از یک باشد، انتخاب خالص و اگر برابر یک باشد، انتخاب خنثی را در طی تکامل این ژن‌ها نشان می‌دهد (۲۸). در این پژوهش، مقدار عددی این نسبت (dN/dS) برای پروتئین‌های لینالول گزارش شده در NCBI در همه گیاهان، کمتر از یک (۰/۷۸) بود و نشان داد که انتخاب خالص بر ژن بررسی شده اتفاق افتاده و سبب تغییرات کلیدی نشده است. نتایج حاصل از بررسی موتیف‌ها و مناطق حفاظت شده و همچنین جداسازی نکردن ژنوتیپ‌ها بر اساس موقعیت جغرافیایی و قرار گرفتن بیشتر ژنوتیپ‌ها در یک گروه، بیانگر شباهت چشمگیر و تنوع پایین میان ژنوتیپ‌ها است که می‌تواند مربوط به حفاظت‌شدگی بالای ناحیه rbcL و تغییرپذیری اندک این ناحیه باشد؛ همچنین مقایسه توالی rbcL در دو رده سیانوباکتری و چند جنس گیاهان، تشابه بسیاری میان توالی آن‌ها نشان داد (۲۹، ۳۰) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

ترمیم زخم مراحل گوناگونی از التهاب، تکثیر و بازسازی دارد که هرکدام از این‌ها، خود از مراحل متعدد دیگری تشکیل شده‌اند که پاره‌ای از آن‌ها باهم تداخل دارند و به‌راحتی از هم تفکیک‌شدنی نیستند (۳۱)؛ بنابراین، بهبود کمی و کیفی هرکدام از مراحل می‌تواند

به تسریع ترمیم زخم و کاهش عوارض ناشی از آن منجر شود. از سویی، مؤثر بودن تشنه‌داری در روند ترمیم می‌تواند به علت وجود ترکیبات گلیکوزیدی ایریدوئیدی در بخش‌های مختلف این گیاه باشد که با مهار تولید پروستاگلاندین E2، اینترلوکین‌های (interleukin) مختلف (IL-1 $\alpha$ , IL2, IL-4)، فاکتور نکروزدهنده تومورگاما و اینترفرون سبب کاهش ادم و ارتشاح سلولی و کاهش تکثیر لنفوسیت‌های T شوند (۳۲، ۳۳)؛ همچنین با افزایش رشد فیروبلاست‌ها، زمینه را برای ترشح بیشتر کلاژن و در نتیجه ترمیم سریع‌تر زخم فراهم می‌کنند (۳۰). علاوه بر این، وجود گلیکوترپنوئیدهای متفاوت در دیگر گونه‌های خانواده تشنه‌داری، سبب کاهش ادم و توقف ارتشاح سلولی می‌شوند و خاصیت ضد التهابی دارند (۳۴). البته وجود گلیکوزیدهای فنیل پروپانوئید که مهارکننده فعالیت ماکروفاژ و در نتیجه، مهار تولید واسطه‌های شیمیایی التهابی و کاهش التهاب است (۳۲) و وجود اسیدهای فنولیک با خاصیت ضدباکتریایی در برخی گونه‌های دیگر تشنه‌داری (۳۳)، دلیل دیگری برای مؤثر بودن تشنه‌داری در التیام زخم معده است.

با توجه به تأثیر مثبت تشنه‌داری بر درمان زخم معده و حضور فراوان لینالول در تشنه‌داری و از سویی، حضور گروه‌های چربی و آب‌دوست بودن لینالول نیز عاملی بوده که توانسته است پروتئین VacA را مهار کند. این پژوهش، علاوه بر اینکه می‌تواند صحتی بر پژوهش‌های انجام‌شده پیشین باشد (۱۵، ۲۴)؛ همچنین می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای برای پژوهش‌های آینده برای ارزیابی تأثیر تک‌تک مواد مؤثره تشنه‌داری، به‌ویژه

با توجه به آمار بالای آلودگی توسط هلیکوباکتر پیلوری، محققان کشورهای مختلف جهان تلاش برای شناسایی دقیق همه فاکتورهای ویروالانس هلیکوباکتر پیلوری و مهار آلودگی و یافتن راهکار دقیق شناسایی سوبیه‌های با خطر بالا را در دستور کار خود قرار داده‌اند (۳۹)؛ همچنین بر اساس تحقیقات انجام شده که نشان دادند ژن‌های *cagA* و *VacA* بیشترین نقش را در زخم، عفونت و سرطان معده داشته‌اند و بر اساس نتایج *In Silico* مطالعه حاضر مشخص شد ماده فیتوشیمیایی لینالول که بیشترین بخش عطریات تشنه‌داری را تشکیل می‌دهد، توانایی مهار پروتئین *VacA* را دارد.

### سپاسگزاری

تحقیق حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه زابل با کد اخلاق IR.UOZ.REC.1399.002 تایید شده است.

### References

- Signal V, Gurney J, Inns S, McLeod M, Sika-Paotonu D, Sowerbutts S, et al. *Helicobacter pylori*, stomach cancer and its prevention in New Zealand. Journal of the Royal Society of New Zealand. 2020; 50(3):397-417. <https://doi.org/10.1080/03036758.2019.1650081>
- Ahmadi E, Amini K, Sadeh M. Prevalence of *cagA*, *cagT*, *cagE*, *vacA* and *hrgA* genes in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with gastric cancer in Karaj city, 2016. Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences. 2018; 21(6):562-8.
- De Bruyne E, Ducatelle R, Foss D, Sanchez M, Joosten M, Zhang G, et al. Oral glutathione supplementation drastically reduces *Helicobacter*-induced gastric pathologies. Sci Rep. 2016; 6(1):1-13. <https://doi.org/10.1038/srep20169>
- Hammond CE, Beeson C, Suarez G, Peek Jr RM, Backert S, Smolka AJ. *Helicobacter pylori* virulence factors affecting gastric proton pump expression and acid secretion. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2015; 309(3):G193-G201. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00099.2015>
- Gaddy JA, Radin JN, Cullen TW, Chazin WJ, Skaar EP, Trent MS, et al.

لینالول، بر باکتری هلیکوباکتر پیلوری باشد و در نهایت، برای کم کردن و یا از بین بردن آثار هلیکوباکتر پیلوری استفاده شوند.

گزارش شده که گیاه ماهور (*Verbascum speciocum*) با افزایش قطر عروق خونی (۳۵)، عصاره میوه سنجد (*Elaeagnus angustifolia*) با خاصیت ضدالتهابی و ضددردی (۳۶)، گیاه غاریاکی (*Falcaria vulgaris*) با افزایش کشش پوست (۳۷) و کیوی (*Actinidia Deliciosa*) با خواص پروتئولیتیک (۳۸) می‌توانند بهبود زخم را تسریع کنند. با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی تشنه‌داری و محرک تولید فیبروبلاست بودن آن (۱۵) و نتایج *In Silico* مهار پروتئین *VacA* توسط لینالول در این مطالعه می‌تواند تأییدی بر تأثیر انواع عصاره‌های گیاه تشنه‌داری در ترمیم زخم و عفونت‌ها باشد.

- Helicobacter pylori* resists the antimicrobial activity of calprotectin via lipid A modification and associated biofilm formation. mBio. 2015; 6(6):e01349-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01349-15>
- Idowu A, Mzukwa A, Harrison U, Palamides P, Haas R, Mbao M, et al. Detection of *Helicobacter pylori* and its virulence genes (*cag A*, *dup A*, and *vac A*) among patients with gastroduodenal diseases in Chris Hani Baragwanath Academic Hospital, South Africa. BMC gastroenterology. 2019; 19(1):73. <https://doi.org/10.1186/s12876-019-0986-0>
- Essawi T, Hammoudeh W, Sabri I, Sweidan W, Farraj MA. Determination of *Helicobacter pylori* virulence genes in gastric biopsies by PCR. ISRN gastroenterology. 2013; 2013:Article ID 606258. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/606258>
- Obayashi N, Ohtsuka Y, Hosoi K, Ikuse T, Jimbo K, Aoyagi Y, et al. Comparison of gene expression between pediatric and adult gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2016; 21(2):114-23. <https://doi.org/10.1111/hel.12245>
- Huang JY, Sweeney EG, Sigal M, Zhang HC, Remington SJ, Cantrell MA, et al. Chemodetection and destruction of host urea allows *Helicobacter pylori* to locate

- the epithelium. *Cell host & microbe*. 2015; 18(2):147-56.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.002>
10. Butt J, Blot WJ, Shrubsole MJ, Waterboer T, Pawlita M, Epplein M. Differences in antibody levels to *H. pylori* virulence factors VacA and CagA among African Americans and whites in the Southeast USA. *Cancer Causes & Control*. 2020;1-6. <https://doi.org/10.1007/s10552-020-01295-z>
  11. De M, Krishna De A, Banerjee A. Antimicrobial screening of some Indian spices. *Phytotherapy research*. 1999; 13(7):616-8.
  12. Mehrabi A-A, Fazeli-Nasab B. In vitro culture of *Allium scorodoprasum* spp. *Rotundum*: callus induction, somatic embryogenesis and direct bulblet formation. *Intl J Agri Crop Sci*. 2012; 4(1):1-7.
  13. Fazeli-Nasab B. The effect of explant, BAP and 2,4-D on callus induction of *trachyspermum ammi*. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2018; 12(1):578-86. <https://doi.org/10.5219/953>
  14. Fazeli-Nasab B, Sirousmehr A, Mirzaei N, Solimani M. Evaluation of total phenolic, flavenoeid content and antioxidant activity of Leaf and Fruit in 14 different genotypes of *Ziziphus mauritiana* L. in south of Iran. *Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants*. 2017; 4(4):1-14.
  15. Rezaei-Nasab M, Komeili G, Fazeli-Nasab B. Gastroprotective effects of aqueous and hydroalcoholic extract of *Scrophularia striata* on ethanol-induced gastric ulcers in rats. *Der Pharmacia Lettre*. 2017; 9(5):84-93.
  16. Fazeli-Nasab B. Biological Evaluation of Coronaviruses and the Study of Molecular Docking, Linalool, and Thymol as orf1ab Protein Inhibitors and the Role of SARS-CoV-2 Virus in Bioterrorism. *journal of ilam university of medical sciences*. 2021; 28(6):77-96. <https://doi.org/10.29252/sjimu.28.6.77>
  17. Nasri S, Cheraghi J, Soltanbaygi S. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of alcoholic extract of root and stem of *Scrophularia striata Boiss.* in male mice. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2013; 29(1):74-84.
  18. Amiri H, H. L-Y, Esmaeili A, Samsamnia F, Eghbali D, Viskarami G, et al. Essential oil composition and anatomical study of *Scrophularia striata* Boiss. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2011; 27(2):271-8.
  19. Shooohani B, Hemati AA, Taheri Moghadam M. Effects of *Scrophularia striata* Extract on Wound Healing in Rabbit. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2009; 17(8):9-16.
  20. Babri S, Doosti MH, Fatehi L, Salari AA. The effects of *Scrophularia striata* extract on anxiety and depression behaviors in adult male mice. *Pharmaceutical Sciences*. 2012; 18(2):133-40.
  21. Azadmehr A, Alizadeh-Oghyanous K, Hajiaghvae R, Amirghofran Z, Azadbakht M. Antioxidant and Neuroprotective Effects of *Scrophularia striata* Extract Against Oxidative Stress-Induced Neurotoxicity. *Cell Molecular Neurobiology*. 2013; 33:1135-41.
  22. Azhdari-Zarmehri H, Nazemi S, Ghasemi E, Musavi Z, Tahmasebi Z, Farsad F, et al. Assessment of Effect of Hydro-Alcoholic Extract of *Scrophularia Striata* on Burn Healing in Rat. *Journal of Babol University Of Medical Sciences*. 2014; 16(5):42-8.
  23. Havasyan M, Panahi J, Pakzad A, Davoudian A, Jalilian A, Zamanian-Azdi M. Evaluation of inhibitory effect of extract *Scrophularia (Scrophularia striata)* on *Candida albicans* in vitro. *Medical Journal*. 2012; 36(1):19-23.
  24. Tandon M, Srivastava R, Nagpal R, Khosla P, Singh J. Differential modulation of nociceptive responses to mu and kappa opioid receptor directed drugs by blood glucose in experimentally induced diabetes rats. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)*. 2000; 38(3):242-8.
  25. Samini M, Dehpour A, Babazadeh K. Study of effect of melatonin on water immersion stress-induced gastric lesion. *Tehran University Medical Journal (Tumj)*. 2003; 61(3):178-81.
  26. Bailey TL, Gribskov M. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 1998; 14(1):48-54. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.1.48>
  27. Nei M, Kumar S. Molecular evolution

- and phylogenetics: Oxford university press; 2000. 329 Pages, ISBN: 0-19-513584-9
28. LI WH. Molecular evolution. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, ISBN : 0878934634 , 487 Pages 1997.
29. Bas E, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Escandell JM, López-Ginés C, et al. New insight into the inhibition of the inflammatory response to experimental delayed-type hypersensitivity reactions in mice by scropolioside A. Eur J Pharmacol. 2007; 555(2):199-210.
30. Stevenson PC, Simmonds MS, Sampson J, Houghton PJ, Grice P. Wound healing activity of acylated iridoid glycosides from *Scrophularia nodosa*. Phytotherapy research. 2002; 16(1):33-5.
31. Mortimer P, Burnand K, Champion R, Burton J, Burns D, Breathnach S. Rook's textbook of dermatology. Rook Textbook of Dermatology. 2004.
32. Diaz AMa, Abad MaJ, Fernández L, Silván AM, De Santos J, Bermejo P. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: in vitro anti-inflammatory activity. Life sciences. 2004; 74(20):2515-26.
33. Fernández MA, Garcia M, Saenz M. Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. J Ethnopharmacol. 1996; 53(1):11-4.
34. Giner R-Ma, Villalba Ma-L, Recio Ma-C, Máñez S, Cerdá-Nicolás M, Ríos J-L. Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*. European journal of pharmacology. 2000; 389(2-3):243-52. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00846-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00846-8)
35. Nabiuni M, Oryan S, Ayyobipor M, Bagheri M. Histochemical study of *Verbascum speciosum* extract's effects on the wound healing in rats. Journal of Cell & Tissue. 2011; 2(1):67-75.
36. Moezzi N, Varzi H, Shirali S. Comparing the effect of *Elaeagnus angustifolia* L. extract and *Lowsonia intermis* L. paste, with silver sulfadiazine ointment on wound healing in rat. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2009; 25(2):253-60.
37. Shakibaie D, Pasharavesh L, Khoshboo S, Kaboodi B. The Effect of the " *Falcaria vulgaris*" on deep skin wound remodeling time and skin tension power in rats. Journal of Kermanshah University of Medical Sciences (J Kermanshah Univ Med Sci). 2006; 10(3):187-94.
38. Hafezi F, Elmirad H, Pedram MS. Determination of the Macroscopic Effect of Kiwi Fruit on Wound Healing in Rats (A New Effective Drug for the Treatment of Deep Chronic Wounds). Iranian Journal of Surgery. 2009; 17(1):1-9.
39. Pakbaz Z, Shirazi MH, Pourman MR, Ranjbar R, Hoseini M, Vaise Malekshahi Z, et al. Frequency of sialic acid binding adhesin gene in *Helicobacter pylori* isolated from patient with gastroduodenal diseases. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2013; 18(2):114-20.

## In Silico Analysis of the Effect of *Scrophularia striata* Linalool on VacA Protein of *Helicobacter Pylori*

Fazeli-Nasab B<sup>1\*</sup>

(Received: November 7, 2020

Accepted: January 24, 2021)

### Abstract

**Introduction:** Some plants, such as *Scrophularia striata*, has been traditionally used for the treatment of infection and ulcer among people living in Zagros District. Previous studies revealed the beneficial effect of hydroalcoholic and water extract of *Scrophularia striata* on ethanolic induced oxidative stress and stomach ulcer in rats. This study aimed to conduct a bioinformatics analysis to investigate the effect of linalool on the prevention of *Helicobacter Pylori* VacA protein activity.

**Materials & Methods:** DNA and protein sequences of linalool of *Arabidopsis thaliana* and VacA gene sequence of *Helicobacter pylori* were obtained from the NCBI. The alignment of DNA and protein sequence of VacA and linalool was achieved by Clustalw 2 software. Furthermore, all conserved motif and domains were searched using the MEME online software. The phylogenetic tree was drawn by Mega 5 software. The ExPasyPred3D Swiss-Model, and Galaxy Web software were used to predict the third structure and molecular docking based on homology.

**Ethics code:** IR.UOZ.REC.1399.002

**Findings:** Linalool protein sequences in all plants have three motifs (100-300 amino

acids) based on the NCBI. The VacA protein has three types of the second cytoplasm, membrane, and kinase domain. The best molecular docking model was obtained based on the highest level of interaction (21.0) and accuracy (0.133) between linalool and VacA protein. The results showed that some molecular groups, such as aliphatic, polar, and hydrophilic, were found in both VacA and linalool protein structure. The presence of aliphatic and hydrophilic groups in VacA protein could give it the ability to pass through the cells by lymphocyte cells and caused pathogenesis if they could escape from degradation. On the other hand, the presence of these groups in linalool could block the VacA protein effect.

**Discussions & Conclusions:** Bioinformatics analysis showed that linalool eliminated the effects of *Helicobacter pylori*. Furthermore, the results of this study could be used as a scientific basis for future studies to evaluate the effect of each ingredient of *Scrophularia striata*, especially linalool, on *Helicobacter pylori*.

**Keywords:** Gastric cancer, Molecular docking, *Scrophularia striata*, VacA protein

1. Research Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran  
 \* Corresponding author: Email: Bfazeli@uoz.ac.ir