Arch

4th International Conference on Agricultural Sciences Medicinal Plants and Traditional Medicine
CINVU
Kosar University
COMSTECH Inter-Islamic Network on Virtual Universities
KOSAR UNIVERSITY
September 20, 2021 Tbilisi - Georgia

استخراج و جداسازی سیکلیک پپتیدها از عصاره گیاه گل بنفشه *(Viola odorata)*

لادن دیانی[1] ، آزاده طاهری بروجنی[2*]، مسعود صادقی دینانی[3]، حسین هاشم پور[4]

۱-مرکز تحقیقات داروسانی نوین، دپارتمان فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲-مرکز تحقیقات داروسانی نوین، دپارتمان فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دپارتمان فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- گروه فیتوشیمی، دپارتمان شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

چکیده

سیکلوتایدهای گیاهی ترکیباتی هستند که دارای ساختاری حلقوی می باشند که دو انتهای آن به هم متصل شده است و همچنین سه باند دی سولفیدی دارند. مجموع این دو ویژگی منجر می شود که این دسته از ترکیبات پایداری و مقاومت زیادی در شرایط بحرانی دما، pH یا در مقابل آنزیم ها یا ترکیبات شیمیایی از خود نشان دهند. سیکلوتایدها، رنج گسترده ای از فعالیت های بیولوژیک را دارند. بنابراین با توجه این قضیه که اثرات درمانی متعددی از آن ها مشاهده شده است باعث شده تا استخراج سیکلوتایدها از گیاهان امری مهم تلقی شود. سیکلوتایدها در خانواده های مختلفی از گیاهان وجود دارند از جمله گیاهان خانواده Violaceae. در این مطالعه، وجود سیکلوتایدها در گیاه *Viola odorata* بررسی شد. سیکلوتایدها با استفاده از دی کلرومتان و متانول استخراج شدند و سپس به کمک آب دیونیزه پارتیشنه گردیدند. فاز آبی-الکلی جدا و فریز درای شد. در آخر عصاره خام به دست آمده به کمک کروماتوگرافی مایع تحت خلاء فرکشنه گردید. فراکسیون های به دست آمده، با استفاده از HPLC و MALDI-TOF بررسی و وجود یا عدم وجود سیکلوتایدها در آن ها مشخص گردید. نتایج HPLC بر اساس زمان بازداری و ترکیب فاز متحرک نشان داد که سیکلوتایدها در گیاه *Viola odorata* وجود دارند. طیف MALDI-TOF نیز نشان داد که وزن مولکولی فراکسیون ها در محدوده سیکلوتایدها می باشد. در نهایت، می توان نتیجه گرفت سیکلوتایدها در گیاه *Viola odorata* هستند و می توانند ازگیاه *Viola odorata* جداسازی و استخراج شوند تا برای مصارف مختلف درمانی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: سیکلیک پپتید، استخراج، جداسازی، HPLC، MALDI-TOF

www.SID.ir

Arch

۱-مقدمه

پروتئین‌ها و پپتیدها به خاطر توانایی تاثیر بر واکنش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی (به عنوان نوروترانسمیتر، عملکرد آنزیمی و...) از طریق تداخل با رسپتورها یا تاثیر بر واکنش‌های متابولیسمی، مهم تلقی می‌شوند. آن‌ها می‌توانند با تارگت‌های خاصی باند شوند و اخیرا به عنوان عوامل درمانی تلقی شده‌اند. اما برخلاف این‌که به نظر می‌رسد پروتئین‌ها و پپتیدها برای استفاده‌های درمانی مناسب هستند سدهای بزرگی برای دارورسانی آن‌ها وجود دارد که از این بین مهم‌ترین عامل، پایداری پپتیدها و پروتئین‌ها می‌باشد و علاوه بر این پروتئین‌ها به دلیل اندازه بزرگی که دارند نمی‌توانند به خوبی از غشاهای فیزیولوژیک عبور کنند. پپتیدهای خطی در شرایط فیزیولوژیک و یا توسط آنزیم‌ها به سرعت تخریب می‌شوند و در نتیجه فعالیت بیولوژیک خود را از دست می‌دهند. برای غلبه بر این مشکل اصلاحات متعددی در ساختار پپتیدها ایجاد شده است از جمله انکپسوله کردن به صورت نانوپارتیکل یا میکروپارتیکل، کنژوگه کردن با آلبومین یا پلی اتیلن گلیکول. اما سیستم‌های جدید مبتنی بر پپتیدها، براساس استفاده از پپتیدهای حلقوی هستند (Kwon S, et al 2018, Räder F, 2018).

پپتیدهای حلقوی در حیطه‌ی درمانی بسیار موفق بوده‌اند. مثالی از پپتیدهای حلقوی که به عنوان دارو استفاده می‌شوند، هورمون‌ها یا آنالوگ‌های هورمونی مثل اکسی توسین، اکترئوتاید و وازوپرسین همچنین آنتی بیوتیک‌هایی مانند وانکومایسین، داپتومایسین و پلی میکسین بی و از بین داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی، داروی سیکلوسپورین می‌باشد. موفقیت این دسته از پپتیدها را به عنوان عامل درمانی، می‌توان به چند ویژگی مطلوب آن‌ها نسبت داد. اول این که پپتیدهای حلقوی مساحت سطحی زیادی دارند و افینیتی و انتخاب پذیری بالایی برای اتصال به تارگت پیدا می‌کنند. دوم، پپتیدهای حلقوی حداقل سمیت را دارند و گاهی سمیتی نداشته‌اند. سوم، پپتیدهای حلقوی را به راحتی می‌توان با توجه به اهداف اصلاح کرد. چهارم، به جهت ایجاد ساختارهای حلقوی، کنفورماسیون مولکول، انعطاف‌پذیری کمتری دارد و ریجیدیتی آن بیشتر است در نتیجه سطح انرژی آزاد گیبس در آن پایین‌تر می‌آید و به همین دلیل ساختارها پایدارتر هستند و پیوندهای با افینیتی بالاتری را برقرار می‌کنند. پنجم، تمایل بیشتر برای برقراری پیوندهای هیدروژنی داخلی دارند. از طرفی پپتیدهای حلقوی نسبت به پروتئین‌ها، مولکول‌های کوچکتری هستند و تهیه و یا جداسازی آن‌ها هزینه کمتری دارد (Abdalla MA et al 2018, Fouché M et al 2016, Zorzi A et al, 2017).

سیکلوتایدها بزرگترین دسته از پپتیدهای حلقوی می‌باشند که در حدود ۲۴ تا ۳۷ آمینواسید دارند با وزن مولکولی بین ۲/۳-۴/۷ کیلودالتون و به طور طبیعی در گیاهان خانواده‌های Violaceae, Rubiaceae, Fabaceae, Solanaceae و Cucurbitaceae یافت می‌شوند. همگی آن‌ها ساختار منحصر به فردی دارند و در آن‌ها سر به دم متصل شده است (دو انتها به یکدیگر متصل شده اند). به سیکلوتایدها همچنین پروتئین‌های CCK[1] نیز گفته می‌شود (Bobey AF et al, 2018, Gould A et al, 2011, Malagón D et al, 2013).

[1] Cyclic Cystine Knot

www.SID.ir

Arch

در سیکلوتایدها قسمت حلقوی به این صورت به وجود می‌آید که یک قسمت پپتیدی به قسمت دیگر با باند آمیدی یا سایر پیوندهای پایدار مانند لاکتون، اتر، تیواتر، دی‌سولفید و... به هم متصل می‌شوند. حلقوی شدن از طریق N به C (سر به دم) منجر به تشکیل باند آمیدی بین گروه‌های انتهایی آمینو و کربوکسیل می‌شود (Joo SH, 2012) در نتیجه به جهت نبود دو انتهای کربوکسیل و آمینو، این ساختارها در مقابل اگزوپپتیدازها مقاوم هستند و نفوذپذیری غشایی آن‌ها بالاتر می‌رود. حلقوی شدن به ذاته باعث ایجاد حفاظت در مقابل اگزوپپتیدازها و اندوپپتیدازها نیز می‌گردد (Thapa P et al, 2014). همچنین سیکلوتایدها، به خاطر وجود شش آمینواسید سیستئین دارای سه باند دی سولفیدی هستند و به همین دلیل گره های سیستینی در ساختار آن‌ها ایجاد می‌شود. ترکیب این دو ویژگی ساختاری باعث شده تا در این دسته از پپتیدها ویژگی‌های استثنایی ایجاد گردد (Weidmann J et al, 2016). از جمله آن‌ها پایداری بالا در مقابل حرارت، ترکیبات شیمیایی، تغییرات pH و آنزیم‌های گوارشی می‌باشد و در مقابل آنزیم‌های پرتئولیتیک نیز مقاوم هستند (Malagón D et al, 2013).

به دلایل ذکرشده، سیکلوتایدها می توانند گزینه مناسبی برای بررسی و مطالعه باشند که از منابع طبیعی مانند گیاهان نیز قابل استخراج هستند و به همین جهت هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی سیکلوتایدها از گیاه *Viola odorata* می باشد.

۲- روش تحقیق

۲-۱جمع آوری و شناسایی گیاه

گیاه *Viola odorata* از غرب مازندران که در شمال کشور ایران است در اوایل فصل بهار که فصل گل دهی این گیاه می باشد جمع آوری شد. قسمت های هوایی گیاه شامل گل، برگ و ساقه برای انجام مطالعه جدا شدند. برای استخراج پپتید، قسمت‌های هوایی گیاه *Viola odorata* استفاده به کار برده شد. پس از جمع آوری، گیاهان به دقت شسته شده و سپس در سایه در دمای محیط خشک شدند. در مرحله بعد این گیاهان به کمک یک آسیاب به پودر ریز و هموژن آسیاب گردیدند تا اندازه ذره ای کوچک شود و همچنین حلال به خوبی نفوذ کند تا استخراج به خوبی انجام گیرد.

۲-۲ استخراج سیکلیک پپتیدها از گیاه بنفشه

برای شروع استخراج، به ۶ کیلوگرم پودر تهیه شده، ۲۰ لیتر مخلوط دی کلرومتان و متانول با نسبت ۱:۱ اضافه و به مدت سه شبانه روز خیسانده شد. عصاره‌گیری در دمای محیط انجام گرفت. پس از سه بار تکرار عصاره‌گیری (هر بار ۲۰ لیتر مخلوط حلال)، عصاره حاصل با کمک کاغذ واتمن فیلتر شد تا باقیمانده گیاهی از آن جدا شود. سپس با دستگاه روتاری متصل به خلا در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ تغلیظ صورت گرفت.

۲-۳ پارتیشنه کردن عصاره به دست آمده

عصاره حاصل با آب دیونیزه به نسبت حجمی نیم مجددا سوسپانسیون شده و توسط قیف جدا کننده پارتیشنه گردید. برای اطمینان از جداسازی کامل، یک شبانه روز زمان داده شد. پس از گذشت یک شبانه روز فاز آبی –الکلی جدا شده

www.SID.ir

Arch

و با روتاری تغلیظ شد. انتظار می‌رود فاز آبی-الکلی، شامل پپتیدهای حلقوی و فاز دی کلرومتان، حاوی ترکیبات غیرپلار شامل چربی‌ها و کلروفیل باشد. فاز آبی-الکلی پس از تغلیظ به کمک روتاری با استفاده از فریزدرایر خشک گردید.

۲-٤ تخلیص و جداسازی سیکلیک پپتیدها

جهت تخلیص، نمونه حاصل روی ستون VLC[1] حاوی ماده جاذب C18 منتقل شد. سپس عصاره خام حاصل از مرحله قبل در بافرآمونیوم استات (pH~8, 0.1M) حل شده و پس از آن با استفاده از کروماتوگرافی مایع تحت خلاء فرکشنه شد. در ابتدا، ستون با یک حجم متانول فعال گردید و سپس دو حجم بافر آمونیوم استات از آن عبور داده شد. در مرحله بعد نمونه روی ستون لود گردید و بعد از آن با اتانول ۳۰٪، ۵۰٪ و ۸۰٪ ستون شسته شد. فراکسیون های ۵۰٪ و ۸۰٪ جداسازی شدند و فریزدرای گردیدند.

۲-۵ شناسایی پپتیدها با استفاده از کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC)

جهت انجام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای شناسایی و پی بردن به وجود سیکلوتایدها، از ستون HPLC (ستون Navapack, 3.9×300mm) و ماده جاذب C-18 و اندازه ذره‌ای ۵ میکرومتر برای بررسی نهایی استفاده گردید. در سیستم HPLC از سیستم گرادیان استفاده شد که فاز متحرک آن شامل حلال های A:B به صورت گرادیان پیوسته از نسبت ۹۵:۵ تا ۲۰:۸۰ و با سرعت جریان موبایل فاز ۱ میلی لیتر بر دقیقه بود. حلال A حاوی آب دیونیزه همراه با ۰/۰۵٪ تری فلورواستیک اسید (TFA) و حلال B حاوی استونیتریل و ۰/۰۵ ٪ تری فلورواستیک اسید بوده است. بررسی در طول موج ۲۱۵ نانومتر انجام گرفت.

۲-٦ آنالیز و شناسایی پپتیدهای حلقوی با کمک MALDI/TOF

جهت شناسایی و تایید سیکلوتایدها از طیف جرمی با روش MALDI/TOF یا یونیزاسیون لیزری با تجزیه‌گر جرمی زمان پرواز استفاده شد.

۳-یافته ها

۳-۱ بررسی کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC):

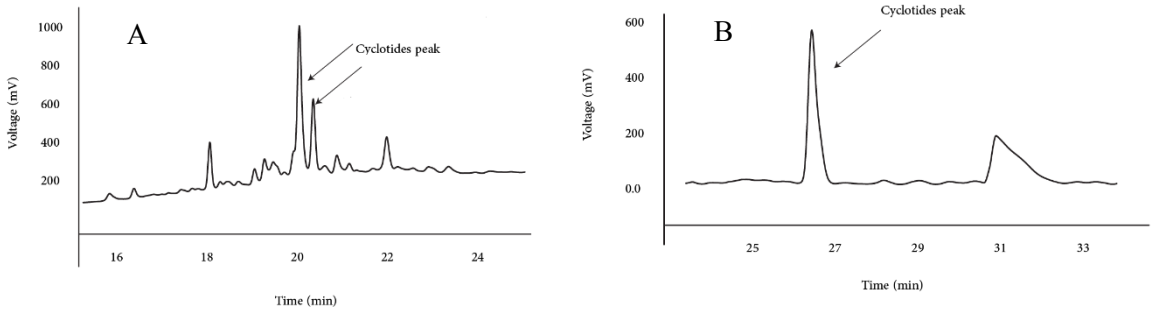
شکل ۱ کروماتوگرام مربوط به نتایج HPLC فراکسیون های ۵۰٪ و ۸۰٪ را نشان می دهد. همانطور که مشخص است، سیکلوتایدهای متعددی در این دو فراکسیون وجود دارد. در کروماتوگرام HPLC مربوط به سیکلوتایدها دو فاکتور مهم است. یکی زمان بازداری[2] که در حدود ۳۰-۲۰ دقیقه می باشد و دیگری ترکیب فاز متحرک است. به این معنی که در طی فرآیند جداسازی، سیکلوتایدها با موبایل فاز در حدود ۶۰-۵۰٪ استونیتریل از ستون خارج می شوند. بنابراین در

[1] Vacuum liquid chromatography
[2] Retention time

www.SID.ir

Arch

شکل ۱ مشخص است که هر دو فراکسیون ۵۰٪ و ۸۰٪ حاوی سیکلوتاید می باشند و کروماتوگرام آنها نیز هر دو فاکتور را دارد و در نتیجه تایید کننده وجود سیکلوتایدها می باشند.



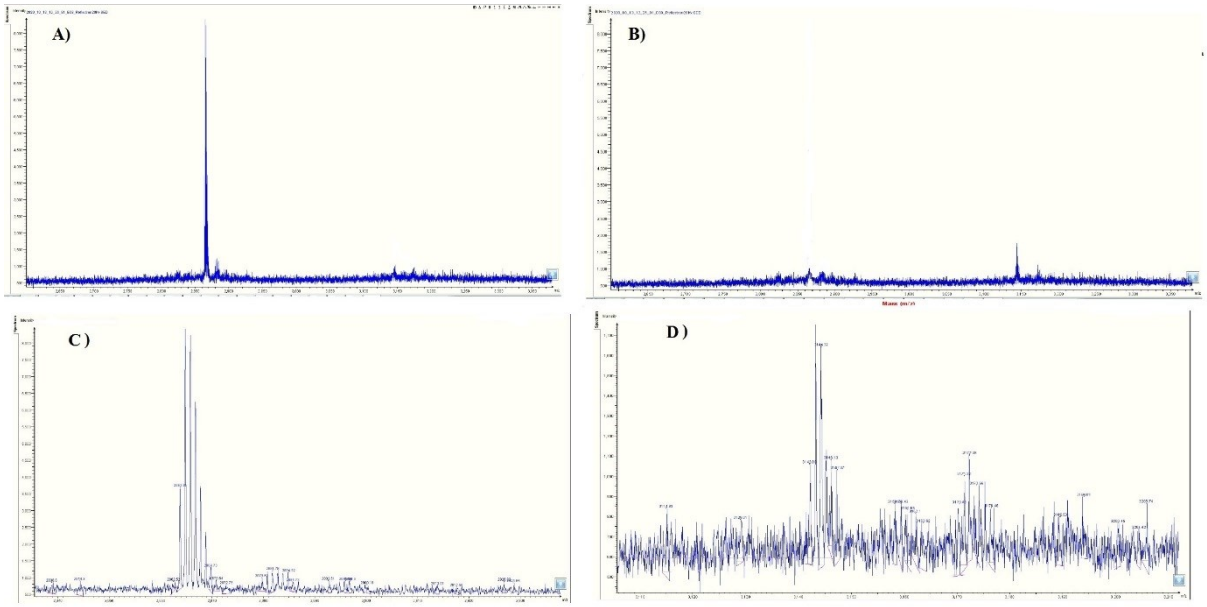
شکل ۱: نتایج کروماتوگرام مربوط به فراکسیون های به دست آمده از کروماتوگرافی مایع تحت خلا :A) کروماتوگرام فراکسیون ۵۰٪ B) کروماتوگرام فراکسیون ۸۰٪

۳-۲ بررسی طیف MALDI-TOF:

شکل ۲، نتایج طیف مربوط به MALDI-TOF دو فراکسیون ۵۰٪ و ۸۰٪ را نشان می دهد. در شکل A-۲ طیف کلی از فراکسیون ۵۰٪ مشخص شده است. همانطور که مشخص است، پیک بلندی در آن دیده می شود که در محدوده ۲۸۰۰-۲۹۰۰ دالتون می باشد که بیانگر وجود سیکلوتایدها است به این دلیل که وزن مولکولی سیکلوتایدها به طور کلی در حدود ۲/۴-۳/۷ کیلودالتون می باشد. شکل B-۲ نیز طیف کلی مربوط به فراکسیون ۸۰٪ را نشان می دهد. دراین طیف نیز پیک هایی در محدوده ۳۲۰۰-۳۱۰۰ دالتون مشاهده می شود و این پیک ها نیز مربوط به سیکلوتاید می باشند. شکل C-۲ طیف گسترده از فراکسیون ۵۰٪ را نشان می دهد. این طیف مشخص می کند که دو سیکلوتاید به طور عمده در این فراکسیون وجود دارد که به ترتیب وزن مولکولی ۲۸۶۳/۰۵ و ۲۸۷۹/۸ دالتون را دارند. شکل D-۲ نیز طیف گسترده شده از فراکسیون ۸۰٪ را نشان می دهدو در این طیف نیز، سیکلوتایدهای با وزن مولکولی ۳۱۴۲/۰۵ و ۳۱۷۰/۴ دالتون مشخص شده است.

www.SID.ir

Arch



شکل ۲: نتایج طیف MALDI-TOF مربوط به فراکسیون های ۵۰٪ و ۸۰٪. A) طیف کلی از فراکسیون ۵۰٪ B) طیف کلی از فراکسیون ۸۰٪ C) طیف گسترده از فراکسیون ۵۰٪ D) طیف گسترده از فراکسیون ۸۰٪

۳-۳ بررسی سیکلوتایدها در دیتابیس Cybase:

جدول ۱ تمام سیکلوتایدهای شناسایی شده در طیف MALDI-TOF را نشان می دهد. وزن مولکولی ترکیبات به دست آمده در قسمت قبل که همگی در محدوده وزن مولکولی سیکلوتایدها می باشند در دیتابیس Cybase سرچ شد تا نام سیکلوتاید پیشنهادی مشخص شود و ویژگی های آنها تعیین گردد. از جمله این که این سیکلوتایدها Möbius هستند یا bracelet. لینک دیتابیس مورد استفاده نیز قرار داده شده است.

http://research.imb.uq.edu.au/cybase/index.php?page=welcome

جدول ۱: نتایج حاصل از بررسی وزن مولکولی ترکیبات به دست آمده در طیف MALDI_TOF و جستجوی نام و مشخصات سیکلوتایدها در دیتابیس Cybase

Detected monoisotopic mass $[M+H]^+$	Monoisotopic mass as M	Search results	Monoisotopic and average mass	Sub-family
2863.05	2862.05	Vaby A	2862.11, 2864.23	Mobius
2879.8	2878.8	Viba 30 linear Kalata B12	2878.12, 2880.23 2878.08, 2880.22	Mobius Mobius

www.SID.ir

Arch

3142.05	3141.05	Hypa A cT30	3141.39, 3141.73 3141.34, 3143.65	bracelet bracelet
3170.4	3169.4	cT31	3169.34, 3171.66	bracelet
		HB8	3169.36, 3171.70	bracelet

بحث و نتیجه‌گیری

کشف و استخراج سیکلوتایدها در زمینه های مختلفی کاربرد دارد. به خصوص که از سیکلوتایدها اثرات درمانی مختلف و قابل قبولی مشاهده شده است. سیکلوتایدها به طور طبیعی در گیاهان خانواده‌های Violaceae, Rubiaceae, Fabaceae, Solanaceae و Cucurbitaceae یافت می‌شوند. بنابراین شناسایی سیکلوتایدها در گیاهان مختلف بسیار مهم می باشد تا بتوان اثرات سیکلوتایدهای موجود در آن را بررسی کرد. گیاه *Viola odorata* از خانواده Violaceae می باشد که اثرات درمانی متعددی از آن مشاهده شده است. به همین جهت هدف از این مطالعه استخراج و جداسازی سیکلوتایدها از گیاه *Viola odorata* است.

در این مطالعه با توجه به نتایج HPLC (شکل ۱) و MALDI-TOF (شکل ۲) مشخص شد که گیاه *Viola odorata* دارای مقادیر زیادی از سیکلوتاید می باشد که این خود نتیجه ای بسیار با ارزش است چرا که نشان داده شده است می توان با کروماتوگرافی مایع تحت خلا یا VLC به خوبی فراکسیون هایی غنی از سیکلوتاید تهیه نمود. این مساله در راستای مطالعات قبل می باشد. در مطالعات گذشته نیز اثبات شده است که گیاهان خانواده Violaceae دارای سیکلوتاید هستند (Hashempour et al. 2011). گیاه *Viola odorata* نیز گیاهی بومی ایران است و به راحتی در دسترس می باشد و بنابراین به راحتی می توان از آن برای استخراج سیکلوتایدها استفاده نمود.

سیکلوتایدها به طور طبیعی به عنوان متابولیت ثانویه در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان به کار می‌روند. این ترکیبات به طور عمده در برگ، ریشه، ساقه و بافت‌هایی که بیشتر درمعرض حمله آفات، حشرات و کرم‌ها هستند، وجود دارند (Malagón D et al, 2013). سیکلوتایدها فعالیت‌های متعددی دارند از جمله اثرات آنتی میکروبیال، حشره کشی و آفت کشی، اثرات ضد کرم و ضد HIV (Slazak B, 2018). همچنین اغلب برای سرطان، بیماری‌های متابولیک، چاقی، درد، التهاب و سرکوب سیستم ایمنی در بیماری مالتیپل اسکلروزیس و تنظیم کننده رسپتورهای کوپل شده با پروتئین G نیز کاربرد دارند (Bobey AF et al, 2018, Poth AG et al, 2019). به همین دلیل جداسازی و استخراج سیکلوتایدها امری مهم به نظر می رسد. در این مطالعه نیز اثبات گردید که سیکلوتایدها در گیاه *Viola odorata* وجود دارد و بنابراین می توان انتظار داشت که این ترکیبات در بیماری های مختلفی اثربخش باشند.

سیکلوتایدها به سه زیرگروه تقسیم می‌شوند: ۱) Möbius ۲) bracelet ۳) مهارکننده‌های تریپسین (Craik D.J et al, 2017).

www.SID.ir

Arch

ساختار Möbius و bracelet بسیار به یکدیگر نزدیک هستند. تفاوت زیرگروه‌های Möbius و bracelet به خاطر حضور یا عدم حضور cis-Proline بین سیستئین‌های ۵ و ۶ در لوپ ۵ و در نتیجه چرخش ۱۸۰ درجه در ساختار پپتیدی می‌باشد که در Möbius این حالت وجود دارد و در bracelet خیر. زیرگروه بعدی مهارکننده‌های تریپسین می‌باشند که توالی های متفاوتی نسبت به دو زیرگروه دیگر دارند و دسته کوچکتری هستند و به طور معمول cyclic knottins نامیده می‌شوند (Slazak B et al, 2018). در این مطالعه پس از بررسی وجود سیکلوتایدها با استفاده از HPLC و تایید نهایی با کمک MALDI-TOF در دیتابیس معتبر Cybase نوع سیکلوتایدهای محتمل در گیاه *Viola odorata* مشخص گردیدکه نتایج آن در جدول ۱ نشان داده شده است و تعیین شد که هر نوع سیکلوتاید جز کدام دسته می باشد.

در آخر می توان نتیجه گرفت گیاه *Viola odorata* ، گیاهی غنی از سیکلوتاید می باشد که ارزش بالایی برای مطالعه جهت تعیین نوع سیکلوتایدها دارد و همچنین پیشنهاد می شود پس از جداسازی و شناسایی، اثربخشی آنها در حوزه های مختلفی از جمله بیماری های مختلف عفونی، سرطان، ایمنی و.. بررسی گردد.

www.SID.ir

Arch

منابع

Abdalla MA, McGaw LJ (2018) Natural Cyclic Peptides as an Attractive Modality for Therapeutics: A Mini Review. Molecules 23: 2080-99.

Bobey AF, Pinto MEF, Cilli EM, Lopes NP, Bolzani VS (2018) A Cyclotide Isolated from *Noisettia orchidiflora* (Violaceae). Planta medica. 84 (12): 947–52.

Craik D.J, Junqiao Du J. Cyclotides as Drug Design Scaffolds. Current Opinion in Chemical Biology 2017; 38: 8-16. doi:10.1016/j.cbpa.2017.01.018.

Fouché M, Schäfer M, Berghausen J, Desrayaud S, Blatter M, Piéchon P, et al (2016) Design and Development of a Cyclic Decapeptide Scaffold with Suitable Properties for Bioavailability and Oral Exposure. ChemMedChem 11: 1048–59.

Gould A, Ji Y, Aboye TA, Camarero JA (2011). Cyclotides, a Novel Ultrastable Polypeptide Scaffold for Drug Discovery. Current Pharmaceutical Design 17(38): 4294-307.

Hashempour H, Ghassempour A, Daly NL, Spengler B, Rompp A (2011) Analysis of cyclotides in Viola ignobilis by Nano liquid chromatography fourier transform mass spectrometry. Protein Pept Lett 18(7):747–752.

Joo SH (2012). Cyclic Peptides as Therapeutic Agents and Biochemical Tools. Biomolecules & Therapeutics 20(1): 19-26.

Kwon S, Duarte JN, Li Z, Ling JJ, Cheneval O, Durek T, et al (2018) Targeted Delivery of Cyclotides via Conjugation to a Nanobody. American Chemical Society, ACS Chemical Biology 13(10): 2973-80.

Malagón D, Gray DJ, Botterill B, Lovas E, Duke M, Gray C, et al (2013). Anthelminthic Activity of the Cyclotides (kalata B1 and B2) against Schistosome Parasites. Biopolymers: Peptide Science 100(5): 461-70. doi: 10.1002/bip.22229.

Poth AG, Huang YH, Le TT, Kan MW, Craik DJ. Pharmacokinetic Characterization of Kalata B1 and Related Therapeutics Built on the Cyclotide Scaffold. International Journal of Pharmaceutics 2019; 565: 437-46. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.05.001.

Räder F.BA, Reichart F, Weinmüller M, Kessler H (2018) Improving Oral Bioavailability of Cyclic Peptides by N-methylation. Bioorganic & Medicinal Chemistry 26: 2766-73. doi:10.1016/j.bmc.2017.08.031.

Slazak B, Kapusta M, Strömstedt AA, Słomka A, Krychowiak M, Shariatgorji M, et al. How Does the Sweet Violet *(Viola odorata* L.) Fight Pathogens and Pests – Cyclotides as a Comprehensive Plant Host Defense System. Frontier in Plant Science 2018; 9: 1296-312. doi: 10.3389/fpls.2018.01296.

Thapa P, Espiritu MJ, Cabalteja C, Bingham JP (2014) The Emergence of Cyclic Peptides: The Potential of Bioengineered Peptide Drugs. International Journal of Peptide Research and Therapeutics 20(4):545-51. doi:10.1007/s10989-014-9421-0.

Weidmann J, Craik DJ (2016) Discovery, Structure, Function, and Applications of Cyclotides: Circular Proteins from Plants. Journal of Experimental Botany 67(16): 4801–12. doi:10.1093/jxb/erw210.

Zorzi A, Deyle K, Heinis C (2017). Cyclic Peptide Therapeutics: Past, Present and Future. Current Opinion in Chemical Biology 38:24-29. doi:10.1016/j.cbpa.2017.02.006.

www.SID.ir