ORIGINAL ARTICLE

Effect of Genetically Modified Rice on Some Intestinal Microbial Flora in Rats

Bahador Hajimohammadi[1],
Gilda Eslami[2],
Hengameh Zandi[3],
Saeedeh Sadat Hosseini[4],
Mehrnoosh Shirdeli[5],
Elahe Loni[5],
Salman Ahmadian[6],
Vahideh Askari[7],
Maryam Sheykhzadegan[4],
Raziyeh Barzegar-bafroui[5],
Hossein Fallahzadeh[8],
Mahmoud Vakili[9]

[1] Associate Professor, Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[2] Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[3] Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[4] MSc in Medical Microbiology, Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[5] MSc in Food Hygiene and Safety, Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[6] MSc in Parasitology, Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[7] MSc in Immunology, Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[8] Professor, Department of Biostatistics and Epidemiology, Faculty of Public Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[9] Associate Professor, Department of Community and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

(Received November 7, 2021; Accepted June 27, 2022)

Abstract

Background and purpose: Transgenic rice is a type of rice that its genetic sequence has been changed to improve its quantity and quality. Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice expresses Cry1Ab protein and is named Tarom Molaii. There are no studies on the effect of this type of transgenic rice on gastrointestinal health in Iran, so, this study investigated the effect of Tarom Molaii transgenic rice on common microbial flora of rat intestine.

Materials and methods: In this experimental study, 24 Sprague Dawley (SD) rats received transgenic and non-transgenic rice in their diets for 90 days and were compared with the control group that received standard rat diet. The number of *Escherichia coli*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Enterococcus* bacteria and the total number of aerobic and anaerobic bacteria in fecal samples were examined in jejunum, ileum, and duodenum samples on days 60, 90, and after killing the rats.

Results: The study showed that except for the total number of anaerobic bacteria in the stool sample on day 90, there was no significant relationship between the study groups and the number of bacteria (P>0.05). There was an increase in the number of intestinal *Lactobacillus* in the transgenic rice-fed group and a decrease in the number of anaerobic bacteria in the transgenic rice-fed group compared with the control group and the non-transgenic rice-fed group.

Conclusion: Consumption of transgenic rice in current study had no considerable effect on the number of common bacteria in the intestinal normal flora. But, long-term studies are needed in other laboratory animals.

Keywords: Tarom Molaii, transgenic rice, intestinal microbial flora, anaerobic bacteria, aerobic bacteria

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (211): 13-24 (Persian).

Corresponding Author: Hengameh Zandi - Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran. (E-mail: hengameh_zandi@yahoo.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 211 مرداد سال 1401 (24-13)

تاثیر مصرف برنج تراریخته طارم مولایی بر برخی از باکتری‌های فلور میکروبی روده رت

بهادر حاجی‌محمدی[1]
گیلدا اسلامی[2]
هنگامه زندی[3]
سعیده‌سادات حسینی[4]
مهرنوش شیردلی[5]
الهه لونی[5]
سلمان احمدیان[6]
وحیده عسکری[7]
مریم شیخ‌زادگان[4]
رضیه برزگربفروئی[5]
حسین فلاح‌زاده[8]
محمود وکیلی[9]

چکیده

سابقه و هدف: برنج تراریخته، برنجی است که با هدف ایجاد ویژگی جدید، در توالی آن تغییراتی ایجاد شده است. برنج تراریخته Bt (*Bacillus thuringiensis*) با عنوان طارم مولایی بیان‌کننده پروتئین Cry1Ab است. با توجه به عدم وجود مطالعه در راستای تاثیر برنج تراریخته طارم مولایی بر سلامت دستگاه گوارش و اهمیت این موضوع، در این مطالعه به بررسی تاثیر مصرف برنج تراریخته طارم مولایی بر فلور میکروبی روده رت پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مداخله‌ای- تجربی تعداد 24 رت از نژاد SD (Sprague Dawley) تحت رژیم غذایی برنج تراریخته و غیرتراریخته به مدت 90 روز قرار گرفتند و با گروه کنترل (غذای استاندارد رت) مقایسه شدند. تعداد باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *بیفیدوباکتریوم*، *لاکتوباسیلوس*، *انتروکوکوس* و تعداد کل باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی در نمونه‌های مدفوع روز 60 و90 و همچنین پس از کشته شدن رت‌ها، در نمونه های ژژنوم، ایلئوم و دئودنوم بررسی شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه، به جز تعداد کل باکتری‌های بی‌هوازی در نمونه مدفوع روز 90، بین گروه‌های مورد مطالعه و تعداد انواع باکتری‌های مورد بررسی ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (P>0/05) و افزایش در تعداد *لاکتوباسیلوس* روده گروه تغذیه شده با برنج تراریخته و کاهش در تعداد باکتری‌های بی‌هوازی گروه تغذیه شده با برنج تراریخته در مقایسه با گروه کنترل و گروه تغذیه شده با برنج غیرتراریخته دیده شد.

استنتاج: اگرچه در مطالعه حاضر مصرف برنج تراریخته بر تعداد باکتری‌های شایع فلور روده تاثیر مشهودی نداشت، اما برای ارزیابی جامع در این زمینه نیاز به انجام مطالعات بلند مدت در سایر حیوانات آزمایشگاهی است.

واژه های کلیدی: برنج تراریخته، طارم مولایی، فلور میکروبی روده، باکتری‌های بی‌هوازی، باکتری‌های هوازی

مقدمه

گیاهان تراریخته یا اصلاح ژنتیک شده (Genetically Modified Plants)، انواعی از گیاهان هستند که با اهداف بهینه‌سازی محصول و ایجاد صفات مطلوب از طریق علم مهندسی ژنتیک کشاورزی و افزودن

مولف مسئول: هنگامه زندی- یزد: دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، دانشکده پزشکی E-mail: hengameh_zandi@yahoo.com
1. دانشیار، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
2. دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
3. دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
4. فوق لیسانس میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
5. فوق لیسانس بهداشت و ایمنی مواد غذایی، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
6. فوق لیسانس انگل شناسی، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
7. فوق لیسانس ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
8. استاد، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
9. دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران
تاریخ دریافت : 1400/8/16 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1400/9/28 تاریخ تصویب : 1401/4/5

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]

ژن‌هایی خاص، در توالی ژنتیک آن‌ها تولید می‌شوند. این اهداف عمدتاً شامل افزایش بازدهی اقتصادی تولید محصول، مقاومت به علف‌کش‌ها، مقاومت به آفات و کاهش استفاده از سموم شیمیایی سنتتیک در مزارع کشاورزی است(3-1).

برنج (*Oryza sativa* L.) پس از ذرت دومین محصول کشاورزی پرتولید در جهان است(4) و منحصراً به منظور مصرف انسان کشت می‌شود. این گیاه، قوت غالب بیش از 3/5 میلیارد نفر در جهان می‌باشد که حدود نیمی از جمعیت کنونی دنیا را تشکیل می‌دهند و در بیش از یکصد کشور دنیا مصرف می‌شود. حدود 21 درصد از سرانه جهانی انرژی مورد نیاز جوامع انسانی از برنج تامین می‌شود که این رقم در کشورهای در حال توسعه بالاتر است(5). بدیهی است که در عصر حاضر تامین مقادیر کافی برنج مورد نیاز این جمعیت در حال رشد، با استفاده صرف از روش‌های سنتی میسر نبوده و به‌کارگیری دانش و فناوری‌های نوین به منظور حل این نیاز حیاتی اجتناب‌ناپذیر است. در طول دو دهه اخیر، دانشمندان انواع مختلف برنج تراریخته را با اهداف مختلف گوناگونی تولید کرده‌اند. اولین برنج تراریخته مقاوم به آفات به نام طارم مولایی (*Tarom Molaii cry1Ab*) در کشور ایران تولید شده که در مقابل کرم ساقه خوار (*Chilo suppressalis*) مقاوم است(6) و از شاخص‌ترین انواع برنج تراریخته Bt مقاوم به آفات محسوب می‌شود که دارای ژن *cry* است و این ژن از باکتری گرم مثبت *باسیلوس تورینجینسیس* گرفته شده است. پس از بیان ژن *cry*، پروتئین کریستالی Bt (*Bacillus thuringiensis*) تولید می‌شود که برای بسیاری از حشرات و آفات برنج سمی بوده و از این طریق راندمان تولید محصول را ارتقا می‌دهد(۸،۷). براساس مبانی سلامت غذا، تولید هر محصول جدید و ناشناخته نیازمند انجام مراحل ارزیابی ایمنی است. عموماً حصول ایمنی مواد غذایی مورد مصرف انسان بر پایه نظریه‌ای است که طبق آن باید اطمینان حاصل شود که هیچ ضرری در نتیجه مصرف عامدانه آن غذا در شرایط طبیعی مصرف ایجاد نمی‌شود(9). ارتباط بین سلامت گوارش و بیماری‌های میزبان با مصرف برنج تراریخته موضوع برخی از مطالعات قرار گرفته است و تا کنون اطلاعات پراکنده‌ای از تاثیرات محصولات تراریخته بر سلامت گوارش در دست است. تعدادی از مطالعات ایمن بودن پروتئین Cry را به اثبات رسانده‌اند، زیرا این پروتئین گیرنده‌ای در سطح سلول‌های اپیتلیال پستانداران ندارد و همچنین ماهیت اسیدی معده سبب حذف این پروتئین در سیستم گوارش می‌شود، ولی گزارشاتی مبنی بر تاثیر Cry1Ab و اتصال آن به سطح سلول‌های موکوسی روده و تغییر عملکرد سلول‌های اپیتلیال وجود دارد(10).

با وجود این‌که روده اولین محل برخورد با باکتری‌ها و آنتی‌ژن‌های غذایی نبوده، اما یکی از بزرگ‌ترین محل‌های پاسخ‌های ایمنی در میزبان به شمار می‌رود و نقش مهمی در واکنش‌های متابولیک، جذب مواد غذایی و تنظیم پاسخ‌های ایمنی دارد(۱۲،۱۱) و با وجود سیستم پیچیده‌ای که روده در سیستم گوارش دارد، تحت تاثیر فاکتورهای متفاوت از قبیل pH، محصولات متابولیک، ترکیب فلور روده، پاسخ‌های سیستم ایمنی، فعالیت آنتی اکسیدانی و ساختار اپیتلیالی قرار می‌گیرد(12).

از این میان، ترکیب فلور میکروبی روده ممکن است فاکتور مهمی در پاتولوژی برخی بیماری ها از قبیل سرطان و یا التهاب روده باشد و می‌توان این نتیجه را گرفت که عدم وجود تعادل در میکروبیوتای روده با بیماری‌های متابولیک همراه بوده و از این رو مطالعه در جهت بررسی تاثیرات برنج تراریخته بر سلامت گوارش و بالاخص ترکیب میکروبی روده از اهمیت به سزایی برخوردار است. لذا هدف اصلی این مطالعه بررسی تاثیر مصرف برنج تراریخته طارم مولایی بر باکتری‌های شایع فلور میکروبی روده رت بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مداخله‌ای- تجربی، از 24 رت نر و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]

ماده با نژاد SD (Sprague Dawley) و با سن حدود 4 تا 5 هفته‌ای و وزن تقریبی 200 گرم استفاده شد. قبل از تهیه رت‌ها، قفس‌ها به صورت کامل با هیدروژن پراکساید 3 درصد ضدعفونی شدند. رت‌ها 5 روز قبل از آغاز آزمایش به منظور کاهش استرس و عادت به شرایط آزمایشگاهی در حیوانخانه نگهداری شدند. اتاق نگهداری حیوانات دارای رطوبت 40 تا 60 درصد و دمای 22 تا 25 درجه سانتی‌گراد بود. هم‌چنین سیکل نور به صورت 12 ساعت روشن و 12 ساعت خاموش تنظیم شد. هنگام کار با رت‌ها موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد و کلیه مراحل با تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد با کد IR. SSU. SPH.REC. 1396.93 انجام شد. در این مطالعه 2 گروه تیمار بر حسب نوع برنج جیره (سنتی، تراریخته) و یک گروه شاهد (جیره استاندارد رت) وجود داشت. برنج‌ها از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تهیه شد. در هر گروه تیمار، مقدار50 درصد جیره غذایی از برنج تشکیل شده بود. در هر گروه 4 رت نر و 4 رت ماده در نظر گرفته شد و رت‌ها به مدت 90 روز تغذیه شدند. رت‌ها به صورتی در هر گروه قرار داده شدندکه میانگین وزن آن‌ها بین گروه‌های مختلف دارای اختلاف بیش از 20 درصد نباشد. شایان ذکر است کلیه آزمایشات به صورت دوسو کور (Double blind) انجام شد.

در طول دوره آزمایش، نمونه‌های تازه مدفوع (4 تا 5 گرم) در طی بازه‌های زمانی 60 و 90 روزه از 24 رت جمع‌آوری شد و در ظروف مخصوص مدفوع نگهداری شدند. همچنین در پایان دوره 90 روزه پس از بیهوشی و کشتن حیوانات از دئودنوم، ایلئوم و ژژنوم رت‌ها نمونه‌برداری انجام شد و در ظروف استریل به آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انتقال داده شدند. بیهوشی در حیوانات مطابق با دستورالعمل AVMA (13) با ترکیب کتامین-زایلازین (mg/mg) 10:1 صورت گرفت.

کشت نمونه‌ها، شمارش، جداسازی و تعیین هویت فنوتیپی ایزوله‌ها

نمونه‌های مدفوع و روده بلافاصله در محلول سدیم کلراید 0/9 درصد هموژنیزه شده و رقت‌های سریال (10^{-2}،10^{-3}،10^{-1}) در لوله حاوی سرم فیزیولوژی تهیه گردید. سپس از رقت‌های سریال برروی محیط‌های کشت تلقیح شد. جهت کشت نمونه‌های دئودنوم، ایلئوم و ژژنوم نیز این قطعات با استفاده از پنس استریل برش داده شده و در محیط Trypticase Soy Broth (Conda، کانادا) قرار داده شده و بعد از هموژن کردن، رقت‌های سریال مورد نظر(10^{-2}،10^{-3}،10^{-1}) تهیه شد و به منظور شمارش و جداسازی باکتری‌های مهم روده(14) مانند *اشریشیا کلی*، *انتروکوکوس*، *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* به محیط های کشت مورد نظر تلقیح و به روش خطی کشت داده شد. جهت شمارش باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی رقت‌های سریال هر نمونه بر روی دو محیط RCA (Reinforced Clostridial Agar) (Quelab، انگلستان) کشت داده شد و یک پلیت در شرایط هوازی به مدت 24 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد و پلیت دیگر در شرایط بی‌هوازی یعنی درون جار بی‌هوازی و استفاده از گاز پک بی‌هوازی (Merck، آلمان) به‌مدت حداقل 72-48 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. بعد از اتمام گرمخانه‌گذاری، کلنی‌های موجود در پلیت‌ها شمارش شده و با در نظر گرفتن رقت سریال به‌صورت CFU/ml گزارش شدند(15).

جهت جداسازی و شمارش جنس *لاکتوباسیلوس*، رقت‌های سریال هر نمونه برروی محیط MRS (deMan, Rogosa, Sharpe agar) (liofilchem، ایتالیا) تلقیح شده و به‌صورت خطی کشت داده شد. سپس پلیت‌ها درون جار بی‌هوازی و با استفاده از گاز پک بی‌هوازی (Merck ، آلمان) به‌مدت 72-48 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلنی‌های رشد کرده به روش ذکر شده شمارش شدند. جهت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]

تعیین هویت فنوتیپی جنس *لاکتوباسیلوس* از رنگ‌آمیزی گرم و آزمایشاتی مانند کاتالاز، اکسیداز، هیدرولیز ژلاتین، تولید اندول، حرکت و تخمیر قندها استفاده شد(16). در نهایت برای تعیین هویت مولکولی از PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد که در ادامه توضیح داده می‌شود.

جهت جداسازی و شمارش جنس *بیفیدوباکتریوم*، رقت‌های سریال هر نمونه برروی محیط RCA تلقیح شده و به‌صورت خطی کشت داده شد. سپس پلیت‌ها درون جار بی‌هوازی و با استفاده از گاز پک بی‌هوازی (Merck، آلمان) بمدت 72-48 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلنی‌های رشد کرده به روش ذکر شده شمارش شدند. جهت تعیین هویت فنوتیپی جنس *بیفیدوباکتریوم* از رنگ‌آمیزی گرم و آزمایشات کاتالاز، تولید اندول و دیسک‌های تشخیصی کانامایسین، ونکومایسین و کولیستین استفاده شد(17). سپس برای تعیین هویت مولکولی از PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد که در ادامه توضیح داده می‌شود. جهت جداسازی و شمارش باکتری‌های روده‌ای، رقت‌های سریال نمونه‌ها برروی محیط MacConkey agar (Merck، آلمان) تلقیح شده و به مدت 24 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلنی‌های صورتی به روش ذکر شده شمارش شدند. جهت تعیین هویت ایزوله‌های مشکوک به *اشریشیا کلی* از رنگ‌آمیزی گرم و آزمایشات بیوشیمیایی مانند کاتالاز و محیط کشت‌های TSI (TripleSugar Iron)، SIM (Sulfide Indol Motility) (برای بررسی حرکت، تولید اندول و تولید SH2)، Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP)، اوره آگار و سیمون سیترات استفاده شد (Conda، کانادا)(18). جهت جداسازی و شمارش جنس *انتروکوکوس*، رقت‌های سریال نمونه‌ها برروی محیط BEA (Bile-Esculin Agar) (Quelab، انگلستان) تلقیح و به‌صورت خطی کشت داده شد و به‌مدت 24 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند، کلنی‌های سیاه رنگ به روش ذکر شده شمارش شدند. جهت تعیین هویت ایزوله‌های *انتروکوکوس* از آزمایش 6/5 درصد نمک نیز استفاده شد(19).

تعیین هویت مولکولی ایزوله‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم

جهت استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها، از روش جوشاندن استفاده شد(20). سنجش کمی و کیفی DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری (Thermo، آمریکا) و ژل آگارز الکتروفورز (ژل آگارز 0/8 درصد) (فناوران سهند آذر، ایران) انجام شد.

جهت تکثیر ژن 16s rRNA *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیلوس* از پرایمرهای زیر استفاده شد(21):

Bifidobacterium-F:
5`-CGCGTCYGGTGTGAAAG-3`

Bifidobacterium-R:
5`-CCCCACATCCAGCATCCA-3` (224 bp)

Lactobacillus-F:
5`-GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC-3`

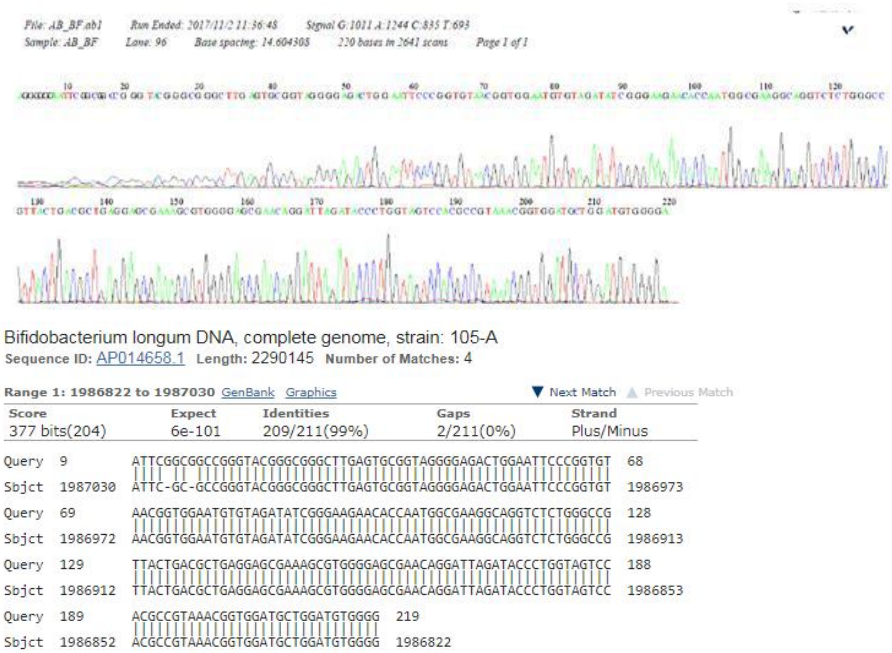
Lactobacillus-R:
5`-GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC-3` (126 bp)

در واکنش PCR برای ژن های هدف، غلظت نهایی برای هر یک از مواد در حجم 20 میکرولیتر شامل 2/5 میکرولیتر آب مقطر تزریقی استریل، 2/5 میکرولیتر از پرایمر کار با غلظت 4 پیکومول/ میکرولیتر، 10 میکرولیتر از Mastermix (Amplicon، دانمارک) و 5 میکرولیتر از DNA استخراج شده بود.

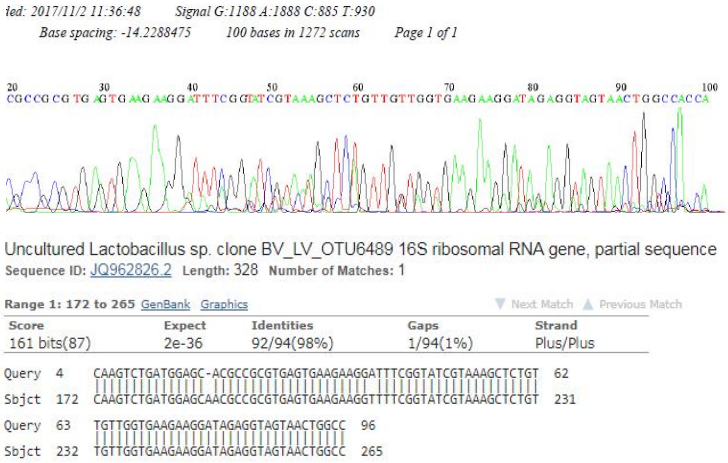
برنامه تکثیر برای ژن‌های هدف با دستگاه ترموسایکلر (ABI، آمریکا) شامل یک چرخه واسرشت اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و به دنبال آن 30 چرخه شامل واسرشتگی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، اتصال در دمای 52/8 درجه سانتی‌گراد (جهت *بیفیدوباکتریوم*) و دمای 62 درجه سانتی‌گراد (جهت *لاکتوباسیلوس*)، گسترش در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه برای هر مرحله و در نهایت یک چرخه گسترش نهایی در دمای 72 درجه

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]

سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه بود. برای هر مرحله و در نهایت یک چرخه قابل ذکر است در تمامی موارد برای کنترل منفی از آب مقطر استریل دو بار تقطیر به جای ژنوم استفاده شد. وجود ژن‌های مورد بررسی با استفاده از آگارز ژل الکتروفورز (ژل آگارز 1/5 درصد) و در کنار 50 bp DNA ladder مورد ارزیابی قرار گرفت، سپس نتایج با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن (ATP، ایران) بررسی شد. در صورت منفی شدن نتایج، آزمایشات تکثیری حداقل سه بار تکرار شد. برای تایید قطعات تکثیر شده از نظر وجود ژن‌های مورد نظر، از ژن‌های تکثیر یافته نمونه‌هایی جهت تعیین توالی (پیشگام، ایران) ارسال شد. نتایج تعیین توالی در NCBI مورد بررسی و BLAST قرار گرفت (تصاویر شماره 1 و 2).



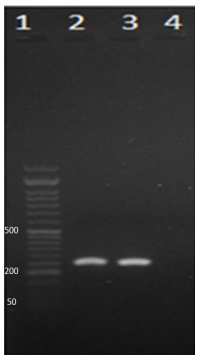
تصویر شماره 1: تایید جنس *بیفیدوباکتریوم* به روش تعیین توالی



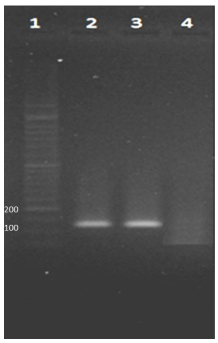
تصویر شماره 2: تایید جنس *لاکتوباسیلوس* به روش تعیین توالی

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]

نتایج حاصل از PCR و تعیین توالی حاکی از تایید جنس *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* بوده است. نتایج بررسی محصول تکثیر ژن‌های 16S rRNA بیفیدوباکتریوم (224 bp) و لاکتوباسیل (126 bp) در تصاویر شماره 3 و 4 نشان داده شده است.



تصویر شماره 1: بررسی محصول ژن شناسایی کننده*بیفیدوباکتریوم*(224bp) ستون 1: 50 bp DNA Ladder، ستون 2و 3: نمونه تکثیر یافته، ستون 4: کنترل منفی



تصویر شماره2: بررسی محصول ژن شناسایی کننده*لاکتوباسیلوس* (126bp) ستون 1: 50 bp DNA Ladder، ستون 2 و 3: نمونه تکثیر یافته، ستون 4: کنترل منفی

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 16 (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون آماری کروسکال والیس بررسی گردید.

یافته ها

در این مطالعه بین مصرف جیره‌های متفاوت غذایی (در سه گروه تراریخته، غیر تراریخته و کنترل) و فراوانی باکتری های مورد مطالعه در نمونه‌های مختلف ژژنوم، ایلئوم، دئودنوم و مدفوع ارتباط معناداری وجود نداشت (P>0/05)، به جز تعداد کل باکتری‌های بی‌هوازی در نمونه مدفوع روز 90 که ارتباط معنادار بین گروه تراریخته و دو گروه دیگر شامل گروه کنترل و گروه تغذیه شده با برنج غیرتراریخته دیده شد (P=0/027)، بدین صورت که در گروه تغذیه شده با برنج تراریخته در تعداد باکتری‌های بی‌هوازی کاهش دیده شده است. از سوی دیگر تعداد *لاکتوباسیلوس* ژژنوم در گروه تغذیه شده با برنج تراریخته نسبت به گروه کنترل و غیر تراریخته کاهش نشان داد. هم‌چنین بین جیره‌های متفاوت غذایی و در نمونه‌های مختلف ژژنوم، ایلئوم، دئودنوم و مدفوع برای *انتروکوکوس* تفاوت معنی‌داری دیده نشد. نتایج همه گروه‌ها در جدول شماره 1 نشان داده شده است.

جدول شماره 1: تعیین و مقایسه تعداد کل باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی، *بیفیدوباکتریوم*، *انتروکوکوس*، *لاکتوباسیلوس* و *اشریشیاکلی* در نمونه‌های ایلئوم، دئودنوم، ژژنوم و مدفوع روزهای 60 و 90 در رت‌های تغذیه شده با برنج تراریخته (A) و غیر تراریخته(B) و غذای معمول رت (C)

باکتری	گروه غذایی	میانگین تعداد کلنی‌ها(cfu/ml (Colony forming unit/mililitre			
		ژژنوم	ایلئوم	دئودنوم	مدفوع روز 60	مدفوع روز 90
کل باکتری های هوازی	A	13/38	14/88	11/56	9/06	12/50
	B	11	9/5	13/69	12/75	12/50
	C	13/12	13/12	12/25	15/69	12/50
	p value	0/750	0/288	0/798	0/141	1
کل باکتری های بی‌هوازی	A	14/12	10/62	14/62	11/31	7/25
	B	11/31	17	9/81	16/44	16/50
	C	12/06	9/88	13/06	9/75	13/75
	p value	0/710	0/054	0/376	0/138	*0/027
بیفیدوباکتریوم	A	15/25	14/50	13/56	10/38	10/62
	B	10/94	11/50	10/94	12/81	14/25
	C	11/31	11/50	13	14/31	12/62
	p value	0/206	0/124	0/590	0/373	0/558
انتروکوکوس	A	14/56	11/62	13/25	10/38	13/12
	B	9/25	12/12	12/06	13/94	13/62
	C	13/69	13/75	12/19	13/19	10/75
	p value	0/179	0/790	0/09	0/567	0/585
لاکتوباسیلوس	A	18/44	13/25	12/81	8/5	11/19
	B	8/38	10/31	11/88	16/50	12/19
	C	10/69	13/94	12/81	12/50	14/12
	p value	0/05*	0/471	0/943	0/076	0/664
اشریشیاکلی	A	13/62	13/25	13/06	12/50	10/88
	B	12/44	13/88	10/75	12/94	15/88
	C	11/44	10/38	13/69	12/06	10/75
	p value	0/821	0/565	0/634	0/970	0/222

*: اختلاف معنی‌داری براساس آزمون Kruskal–Wallis بین سه گروه تغذیه با سطح معنی‌داری 0/05

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]

بحث

رشد جمعیت جهانی و تقاضای رو به افزایش کشت محصولات زراعی از جمله برنج، محققین را بر این داشته تا محصولی فراوان در مقیاسی کوچک تر تولید نمایند. برنج تراریخته Bt این نیاز را فراهم ساخته تا با افزایش کمیت محصول، نیاز جوامع برطرف گردد و از سوی دیگر با آفاتی که سبب کاهش نتیجه و محصول می‌گردند مبارزه شود. از این رو مطالعات حیوانی فراوانی برای دست‌یابی به این هدف صورت گرفته است. گرچه مطالعات در دسترس، کم‌تر به تاثیر برنج تراریخته بر سلامت دستگاه گوارش پرداخته‌اند.

ارزیابی ایمنی برنج تراریخته بیان‌کننده Cry1Ab در زمینه‌های مختلف از جمله مشخص نمودن ترکیبات برنج، بررسی آلرژنیسیته، آنالیزهای بیوشیمیایی و هماتولوژی و آنالیز ادرار در رت‌های تغذیه شده با آن، طی تحقیقات مختلفی صورت گرفته است و عوارض نامطلوبی در پی مصرف این نوع برنج مشاهده نشده است(24-22)، ولی با توجه به بحث‌های متفاوت پیرامون ایمنی محصولات تراریخته، مطالعه حاضر به بررسی تاثیر برنج تراریخته ایرانی با نام طارم مولایی بر سلامت دستگاه گوارش رت پرداخته است.

یکی از نگرانی‌های موجود در زمینه ایمنی برنج تراریخته، تاثیر این نوع از غذاها بر فلور میکروبی روده و انتقال آن به مصرف‌کننده می‌باشد(25) و آن‌چه که مشخص است، فلور میکروبی روده نقش عمده ای در سلامت میزبان بازی می‌کند(26). از جمله ارتباطی که بین میزان pH و محتوی باکتری در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش وجود دارد، می‌توان به مصرف کربوهیدرات‌ها توسط باکتری‌های بی‌هوازی که منجر به تولید استات، پروپیونات، بوتیرات و دی‌اکسیدکربن می‌شود اشاره کرد که این ترکیبات pH را تحت تاثیر قرار می‌دهند و در یک رابطه دو طرفه این تغییر pH سبب تغییر در ترکیب باکتری‌های گوارشی می‌شود(12). در این مطالعه مداخله‌ای- تجربی به بررسی اثر برنج تراریخته طارم مولایی بر فلور میکروبی روده رت پرداخته شده است. مطالعات مشابه در زمینه مصرف محصولات تراریخته از قبیل ذرت، سویا و همچنین برنج‌های تراریخته دیگر وجود دارد و این در حالی است که مطالعه حاضر برای نخستین بار صورت گرفته است(۲۷،۲۸).

در مطالعات پیشین مواجه 6 هفته‌ای حیوان با غذای تراریخته را به‌عنوان کوتاه‌ترین زمان ممکن برای تغییرات فلور میکروبی روده مطرح کرده‌اند و این زمان به‌عنوان حداقل زمانی است که فلور میکروبی روده در اثر مصرف غذا می‌تواند تغییر یابد و تعدادی از بررسی‌ها این زمان را جهت مصرف غذای تراریخته ایمن دانسته‌اند(29). بیش‌ترین نگرانی که در بین افراد جامعه وجود دارد مربوط به تاثیرات بلند مدت غذای تراریخته بر سلامت است. از این‌رو مشابه مطالعات صورت گرفته، دوره 90 روزه جهت بررسی تاثیرات برنج تراریخته انتخاب گردید.

نتایج نشان داد که بین مصرف برنج تراریخته و تعداد باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *لاکتوباسیلوس*، *بیفیدوباکتریوم*، *انتروکوکوس* و تعداد کل باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی ارتباط معناداری وجود ندارد و تفاوتی بین ترکیب باکتری‌ها در قسمت‌های مختلف روده و هم‌چنین نمونه مدفوع گرفته شده در زمان‌های مختلف در سه گروه غذایی انتخاب شده، وجود ندارد به جز تغییرات معنی‌دار ($P<0/05$) که در تعداد کل باکتری‌های بی هوازی نمونه مدفوع روز 90 گروه تغذیه شده با برنج تراریخته در مقایسه با دو گروه دیگر مشاهده شد و کاهش قابل توجهی در این گروه قابل مشاهده بود و همچنین افزایش در تعداد *لاکتوباسیلوس* ژژنوم گروه تراریخته در مقایسه با گروه کنترل و گروه تغذیه شده با برنج غیر تراریخته مشاهده شد.

مکانیسمی که در پس این تغییرات وجود دارد ناشناخته بوده و از این‌رو مطالعات گسترده‌تری نیاز است تا مشخص گردد آیا این تغییرات از لحاظ بیولوژیک معنادار هستند یا خیر. از آن‌جاکه فلور میکروبی روده در توسعه عملکردهای متابولیک و ایمونولوژیک نقش

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]

داشته و عدم تعادل در ترکیب فلور میکروبی سبب بیماری‌هایی از قبیل IBD (Inflammatory Bowel Disease) می‌شود، در نتیجه تعادل در ترکیب فلور میکروبی روده سلامت میزبان را به همراه خواهد داشت و این در حالی است که برهم خوردن این تعادل منجر به بیماری‌های متابولیک می‌گردد. تعدادی از مطالعات موجود، تغییر در تعداد باکتری های مدفوع در نتیجه مصرف برنج تراریخته را نشان داده‌اند، ولی تغییرات هیستوپاتولوژیک نامطلوبی مشاهده نشده است و نیز تعدادی از مطالعات انجام شده همگام با مطالعه حاضر عدم تاثیر غذای تراریخته حامل Bt بر فلور میکروبی روده را به اثبات رسانده‌اند. چنان‌چه Buzoianu و همکاران درسال 2012 با بررسی اثر ذرت تراریخته Bt بر خوکچه از نظر تعداد باکتری‌های *انتروکوکوس*، *لاکتوباسیلوس* و کل باکتری‌های بی‌هوازی در روزهای 0 تا 100 در نمونه مدفوع، ایلئوم و سکوم نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین تعداد باکتری‌های مورد مطالعه و نوع رژیم غذایی وجود ندارد و رژیم غذایی حاوی ذرت Bt بر تعداد باکتری‌های روده تاثیرگذار نمی‌باشد(30). همچنین همسو با این نتایج ذکر شده، Buzoianu و همکاران در سال 2013 با بررسی اثر ذرت تراریخته بیان‌کننده Cry1b بر فلور میکروبی روده خوک و فرزندان متولد شده از آن‌ها، عدم تاثیر رژیم غذایی حاوی ذرت تراریخته بر فلور میکروبی روده که شامل باکتری‌های *انتروباکتر*، *لاکتوباسیلوس* و تعدادکل باکتری‌های بی‌هوازی در نمونه‌های مدفوع، ایلئوم و سکوم بوده است، را نشان دادند(31). مطابق با نتایج مطالعه حاضر، مطالعه‌ای توسط Schroder و همکاران در سال 2007 صورت گرفته است که در آن تاثیرات برنج تراریخته بیان‌کننده Cry1Ab بر فاکتورهای هماتولوژی، بیوشیمیایی و میکروبیولوژی رت مورد مطالعه قرار گرفته است. در این مطالعه 90 روزه، نتایج بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار در تعداد باکتری‌های مدفوع رت‌های تغذیه شده با برنج تراریخته در مقایسه با گروه کنترل بود. البته در راستای این مطالعه، در نمونه کشت دئودنوم 13درصد کاهش در جمعیت *بیفیدوباکتریوم* در رت‌های تغذیه شده با برنج تراریخته در مقایسه با کنترل مشاهده شد و همچنین افزایش 23 درصد در جمعیت کولی فرم‌ها در نمونه ایلئوم دیده شده است(22).

با توجه به مطالعه Liu که به بررسی اثر برنج تراریخته Bt بیان‌کننده پروتئین Cry1Ab بر روده خوک‌ها طی دو نسل پرداخته است، در انتهای مطالعه در روزهای 360 و 420 تغییرات پاتولوژیکی و میکروبیولوژی مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج حاکی از عدم وجود اثرات نامطلوب برنج تراریخته Bt بر روده خوک‌ها بوده است(32). در مجموع می‌توان این مسئله را بیان داشت که سلامت گوارش انسان‌ها دارای طبیعت پیچیده‌ای است که متاثر از فاکتورهای متفاوتی از قبیل پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژی، تغییرات هیستوپاتولوژی و تغییرات پروفایل میکروبی و ... می‌باشد و تمام این فاکتورها در ارتباط با یکدیگر سلامت گوارش و به طبع سلامت میزبان را به همراه داشته و مطالعه تغییرات نامطلوب در هر قسمت می‌تواند راهگشای تصمیم‌گیری در زمینه مصرف محصولات تراریخته گردد.

در نهایت، در مطالعه حاضر مشاهده شد که استفاده از برنج تراریخته طارم مولایی ایرانی بیان‌کننده پروتئین Cry1Ab تاثیری مشهود بر تعداد باکتری‌های فلور میکروبی روده رت ندارد. البته با توجه به تغییرات دو گروه (باکتری‌های بی‌هوازی مدفوع در روز 90 و تعداد *لاکتوباسیلوس*های ژژنوم) نیاز به انجام مطالعات گسترده‌تر می‌باشد. همچنین باید توجه شود که نتایج مطالعه حاضر هیچگاه برای قضاوت در مورد ایمنی برنج تراریخته کافی نیست. بلکه برای دستیابی به یک نتیجه‌گیری جامع در مورد سلامت برنج تراریخته نیاز به انجام مطالعات در سایر حیوانات آزمایشگاهی نظیر موش، میمون، طیور و ... می‌باشد. حتی لازم است در مطالعات آینده به‌طور بلندمدت در بازه‌های زمانی بیش‌تر از 90 روز تاثیر مصرف برنج تراریخته مورد آزمایش قرار گیرد تا اثر تغذیه بلندمدت با برنج تراریخته بر فلور

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]

میکروبی حیوانات نیز مورد ارزیابی واقع شود.

سپاسگزاری

این طرح با حمایت مالی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری با کد گرنت 95/10710 و در آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا- دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انجام گرفته است. بدین وسیله از حمایت‌های این مرکز سپاس و قدردانی می گردد.

References

1. Turnbull C, Lillemo M, Hvoslef-Eide AKT. Global Regulation of Genetically Modified Crops Amid the Gene Edited Crop Boom – A Review. Front Plant Sci 2021; 12: 630396.
2. Nicolia A, Manzo A, Veronesi F, Rosellini D. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. Crit Rev Biotechnol 2014; 34(1): 77-88.
3. Jeon DW, Park JR, Jang YH, Kim EG, Ryu T, Kim KM. Safety verifcation of genetically modifed rice morphology, hereditary nature, and quality. Environ Sci Eur 2021; 33: 37.
4. Choi H, Moon JK, Park BS, Park HW, Park SY, Kim TS, et al. Comparative nutritional analysis for genetically modified rice, Iksan483 and Milyang 204, and nontransgenic counterparts. J Korean Soc Appl Biol Chem 2012; 55(1): 19-26.
5. Bhullar NK, Gruissem W. Nutritional enhancement of rice for human health: the contribution of biotechnology. Biotechnol Adv 2013; 31(1): 50-57.
6. Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia LG, de Palma JM, Liwanag EA, et al. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cryIA (b) gene. Mol Breed 1997; 3(5): 401-414.
7. Hajimohammadi B, Eslami G, Loni E, Ehrampoush MH, Moshtaghioun SM, Fallahzadeh, et al. Relationship between Serum Tumor-Related Markers and Genetically Modified Rice Expressing Cry1Ab Protein in Sprague-Dawley Rats. Nutr Cancer 2022; 74(7): 2581-2590.
8. Hajimohammadi B, Eslami G, Zandi H, Ehrampoush MH, Naimi A, Derakhshan M, et al. Safety assessment of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein in Sprague-Dawley rats. Sci Rep 2021; 11(1): 1126.
9. Cao S, He X, Xu W, Ran W, Liang L, Luo Y, et al. Safety assessment of Cry1C protein from genetically modified rice according to the national standards of PR China for a new food resource. Regul Toxicol Pharmacol 2010; 58(3): 474-481.
10. Vázquez-Padrón RI, Gonzáles-Cabrera J, García-Tovar C, Neri-Bazan L, Lopéz-Revilla R, Hernández M, et al. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. Biochem Biophys Res Commun 2000; 27(1): 54-58.
11. Einspanier R, Lutz B, Rief S, Berezina O, Zverlov V, Schwarz W, et al. Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. Eur Food Res Technol 2004; 218: 268-273.
12. Laparra JM, SnazY. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceutical. Pharmacol Res 2010; 61(3): 219-225.
13. Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, Greenacre C, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]

Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association; 2013.

14. Procop GW. The anaerobic bacteria. In: Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL, editors. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2017. p. 1041-1042.
15. Poulsen M, Kroghsbo S, Schrøder M, Wilcks A, Jacobsen H, Miller A, et al. A 90-day safety study in Wistar rats fed genetically modified rice expressing snowdrop lectin Galanthus nivalis (GNA). Food Chem Toxicol 2007; 45(3): 350-363.
16. Wang J, Chen X, Liu W, Yang M, Zhang H. Identification of Lactobacillus from koumiss by conventional and molecular methods. Eur Food Res Techno 2008; 227(5): 1555-1561.
17. Khomeiri M, Mortazavi SA, Ghoddusi HB, Khamessan A, Ahmad D, Shahidi F. Identification of Bifidobacterium Strains Isolated from Fecal Samples of Some Iranian Subjects Using 16SrRNA Gene Sequence Analysis and PCR-based Gene Specific Primers. JKMU 2005; 12(1): 21-31.
18. Rahman M, Husna A, Elshabrawy HA, Alam J, Runa NY, Badruzzaman AT, et al. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant Escherichia coli from chicken meat. Sci Rep 2020; 10(1): 21999.
19. Eslami H, Shariatifar A, Rafiee E, Shiranian M, Salehi F, Hosseini SS, et al. Decolorization and biodegradation of reactive Red 198 Azo dye by a new Enterococcus faecalis–Klebsiella variicola bacterial consortium isolated from textile wastewater sludge. World J Microbiol Biotechnol 2019; 35(3): 38.
20. Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. Kuwait Med J 2009; 41(2): 117-122.
21. Delroissea JM, Boulvina AL, Parmentierb I, Dauphinc R, Vandenbola M, Portetelle D. Quantification of Bifidobacterium spp. and Lactobacillus spp. in rat fecal samples by real-time PCR. Microbiol Res 2008; 163(6): 663-670.
22. Schroder M, Poulsen M, Wilcks A, Kroghsbo S, Miller A, Frenzel T, et al. A 90-day safety study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein (Bacillus thuringiensis toxin) in Wistar rats. Food Chem Toxicol 2007; 45(3): 339-349.
23. Shirdeli M, Orlov YL, Eslami G, Hajimohammadi B, Tabikhanova LE, Ehrampoush MH, et al. Testing safety of genetically modified products of rice: case study on sprague dawley rats. Russ J Genet Appl Res 2019; 55(8): 962-968.
24. Song H, He X, Zou S, Zhang T, Luo Y, Huang K, et al. A 90-day subchronic feeding study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein in Sprague-Dawley rats. Transgenic Res 2015; 24: 295-308.
25. European food safety authority (EFSA). Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. Food Chem Toxicol 2008; 46(Suppl1): S2-S70.
26. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. Physiol Rev 2010; 90(3): 859-904.
27. Tan J, Sun Z, Zhang H, Wang Y, Liu D. Comparison of broiler performance, carcass yields and intestinal microflora when fed diets containing transgenic (Mon-40-3-2) and conventional soybean meal. Afr J Biotechnol 2012; 11(59): 12371-12378.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]

28. Yuan Y, Xu W, He X, Liu H, Cao S, Qi X, et al. Effects of genetically modified T2A-1 rice on the GI health of rats after 90-day supplement. Sci Rep 2013; 3: 1962
29. Castillo M, Martı´n-Oru´e SM, Anguita M, Pe´rez JF, Gasa J. Adaptation of gut microbiota to corn physical structure and different types of dietary fibre. Livest Sci 2007; 109(1-3): 149-152.
30. Buzoianu SG, Walsh MC, Rea MC, O'Sullivan O, Crispie F, Cotter PD, et al. The effect of feeding Bt MON810 maize to pigs for 110 days on intestinal microbiota. PloS One 2012; 7(5): e33668.
31. Buzoianu SG, Walsh MC, Rea MC, Quigley L, O'Sullivan O, Cotter PD, et al. Sequence-based analysis of the intestinal Microbiota of sows and their offspring fed genetically modified maize expressing a truncated form of Bacillus thuringiensis Cry1Ab protein (Bt Maize). Appl Environ Microbiol 2013; 79(24): 7735-7744.
32. Liu Q1, Yang W1, Li M1, Wang Y1, Zhang H, Wu Y, et al. Effects of Transgenic Bt Rice Containing the Cry1Ab Protein on the Gastrointestinal Health of Highly Inbred Wuzhishan Pigs after Two Generations of Feeding. J Agric Food Chem 2018; 66(40): 10575-10587.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-23]