

«بررسی خواص آنتی اکسیدانی ولیک سیاه (*Crataegus elbursensis*) بر کلیه موش صحرایی نر دیابتی شده»

سحر گرگانی^۱، دکتر مریم مهاجرانی^۲، دکتر اکبر حاجی زاده^۳

۱ کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، شهر بابلسر، کشور ایران

۲ دانشیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، شهر بابلسر، کشور ایران

۳ دانشیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، شهر بابلسر، کشور ایران

Email: m.mohajerani@umz.ac.ir

چکیده

باتوجه به اینکه داروهای شیمیایی محیط زیست را به خطر می اندازد، جایگزینی مانند گیاهان دارویی که عملکرد مناسب تر و خاصیت مشابه با داروهای مصنوعی دارند و همچنین بقایای دارویی آنها باقی نمی ماند تا محیط زیست تخریب شود، بسیار جالب و مورد علاقه محققین قرار گرفته است. به همین سبب در مطالعه ما از گیاه ولیک سیاه به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی و موثر با خواص آنتی اکسیدانی بالا استفاده شد. بیماری دیابت یک بیماری شناخته شده در سطح جهان است که با کمبود انسولین و افزایش سطح قند خون و یک دلیل عمده برای اغلب بیماری های کلیوی است. ما در این مطالعه اثر عصاره ولیک سیاه برای درمان دیابت در موش های آزمایشگاهی اندازه گیری نمودیم.

واژه های کلیدی: آنتی اکسیدان، ولیک سیاه، استرس اکسیداتیو، دیابت، کلیه

۱. مقدمه

با توجه به مسائلی که بهداشت عمومی را به خطر می اندازد، لازم است پژوهش ها به سوی گرایش پیدا کند تا به جای داروهای مصنوعی، از گیاهان دارویی که دارای خاصیت مشابه هستند استفاده شود. عملکرد مناسب، عدم وجود باقی مانده دارویی در محصولات دامی و حفظ محیط زیست سبب شده است که گیاهان دارویی به عنوان جایگزین بالقوه برای فرآورده های مصنوعی مطرح شوند. در سال های اخیر استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی، مانند آنتی اکسیدان های گیاهی، برای حفاظت در برابر آسیب های اکسیداتیو مورد توجه قرار گرفته اند. (Wachtel-Galor and Benzie ۲۰۱۱). ولیک، نام مشترکی در تمام گیاهان جنس (*Crataegus*) از خانواده گل سرخیان (*Rosaceae*) است و مدت طولانی می باشد که به عنوان یک داروی گیاهی استفاده می شود. گیاهان متعلق به این خانواده اهمیت زیادی از لحاظ کاربرد در صنایع آرایشی، غذایی و دارویی دارند. میوه ولیک به عنوان غذا و دارو در چین و اروپا استفاده می شود. (Salmanian, Sadeghi Mahoonak et al. ۲۰۱۴). ولیک سیاه (*Crataegus elbursensis*)، فراوان ترین گونه بومی ایران است و به وفور در جنگل های نواحی شمال کشور یافت می شود. این گیاه به صورت درختچه یا درختان کوچک به ارتفاع ۴ تا ۷ متر است اما گاهی تا ۱۰ متر هم می رسد. گیاه موردنظر دارای میوه های کروی یا بیضی شکل سیاه تا بنفش است که منبع غنی از فلاونوئید های طبیعی، آنتوسیانین ها، تانن ها، آنتی اکسیدان ها و... می باشد که در طب سنتی استفاده می شود. (Salih, Patra et al. ۲۰۲۳)

تاریخچه استفاده از این گیاه به عنوان داروهای سنتی به اواخر دهه ۱۸۰۰ برمی گردد که عملکرد آنها در درمان بی خوابی و ضد چروکیدگی برای درمان آسم بود. میوه ولیک حاوی اسید سینامیک، اسید کافئیک، اسید کلروژنیک و اسید گالیک و همچنین ترکیبات فنلی مانند روتین، کوئرستین و کامفرول است. فعالیت ضد باکتریایی این گیاه به ترکیبات فنلی آن نسبت داده می شود. آنتی اکسیدان های موجود در این میوه حساسیت رگ های خونی را کاهش می دهند و از آسیب عوامل مخرب ایجاد کننده اکسیداسیون (مانند آلودگی ها، مواد شیمیایی موجود در غذاها و...) در رگ ها جلوگیری می کنند. همچنین میزان گرفتگی عروق به علت وجود این آنتی اکسیدان ها کاهش می یابد و غذا رسانی به سلول های قلبی تسهیل می شود، در نتیجه منجر به بهبود جریان خون قلبی و نهایتاً بهتر شدن عملکرد ماهیچه های قلب می گردد. میوه ولیک باعث کم شدن فشارخون در افراد می شود، همچنین از افت فشار نیز جلوگیری می کند. در حقیقت فشارخون را تعدیل می کند. همچنین باعث کاهش فشارخون در بیماران دیابتی نیز می گردد. (Safapour, Sadeghi-Kiakhani and Eshaghloo-Galugahi ۲۰۱۸).

در بسیاری از نقاط جهان، میوه های ولیک به شکل تازه مصرف می شوند یا از آن ها برای تهیه مربا، ژله، نوشیدنی های غیر الکلی، آب نبات، کمپوت میوه و همچنین به عنوان طعم دهنده برای غذاهایی مانند انواع گوشت سفید استفاده می شود. علاوه بر این، میوه ولیک در طول زمستان منبع غذایی مهمی برای بسیاری از پرندگان و پستانداران کوچک است. از برگ ها، گل ها و میوه های ولیک می توان داروهای به شکل قرص، دمنوش و عصاره تهیه کرد. بعضی از گونه های جنس *Crataegus* هم به عنوان گیاهان زینتی استفاده می شوند. (Esmailzadeh, Moradi and Davatgar ۲۰۲۳).

دیابت^۱ یک آسیب یا اختلال متابولیکی در بدن می باشد و به عنوان یک بیماری مزمن یک مشکل مهم بهداشت عمومی است که در حال اپیدمی شدن در سطح جهان بوده و به عنوان پنجمین عامل مرگ در دنیا شناخته می شود. در حالت طبیعی غذا در معده به گلوکز تبدیل می شود و گلوکز از معده وارد جریان خون می شود. پانکراس عضوی از بدن است که هورمون انسولین را ترشح می کند و انسولین باعث می شود که گلوکز از جریان خون وارد سلول های بدن بشود یا به عبارتی مهم ترین منبع انرژی بدن مورد استفاده قرار بگیرد. در نتیجه مقدار قند خون در حد نرمال باقی می ماند. در دیابت توانایی تولید هورمون انسولین در بدن از بین می رود یا بدن در برابر هورمون انسولین مقاوم شده است. بنابراین انسولین تولید شده توسط پانکراس نمی تواند عملکرد طبیعی خود را انجام بدهد. نقش کلیدی هورمون انسولین کاهش قند خون یا همان گلوکز توسط سازوکارهای مختلفی می باشد. بیماری دیابت سه نوع اصلی دارد: دیابت نوع ۱، دیابت نوع ۲، دیابت بارداری. (Ruan, Guo et al. ۲۰۲۳)

کلیه ها به عنوان یک تصفیه کننده خون عمل می کنند و آب اضافی و موادزائد را از خون جدا می کنند و به صورت ادرار از بدن خارج می شود. در بیماری دیابت، به علت تجمع قند در رگ های کوچک کلیه ها دچار آسیب می شوند. ن فروپاتی دیابتی^۲ به بیماری کلیوی دیابت گفته می شود. در حدود ۵۰ درصد از بیماران دیابتی در طول عمرشان می توان نشانه های آسیب کلیوی را مشاهده کرد. از نشانه های ن فروپاتی دیابتی افزایش دفع آلبومین و پروتئین از ادرار، فشارخون بالا و کاهش فعالیت کلیه ها می باشد. (Naaman and Bakris ۲۰۲۳)

استرس اکسیداتیو که ناشی از بهم خوردن تعادل بین رادیکال های آزاد و دفاع آنتی اکسیدان های بدن می باشد و به نفع رادیکال های آزاد تمام می شود در بیماری دیابت روبه افزایش است. در دیابت نوع ۲ چون کاهش حساسیت به انسولین وجود دارد فرد

^۱ Diabetes

^۲ Diabetic nephropathy

دچار هیپرگلیسمی می شود. هیپرگلیسمی مزمن در دیابت باعث تولید بیش از حد رادیکال های آزاد و در نتیجه سبب افزایش استرس اکسیداتیو می شود. (Jomova, Raptova et al. ۲۰۲۳).

آنتی اکسیدان ها باعث خنثی کردن رادیکال های آزاد می شوند. دو راه دفاع آنتی اکسیدان وجود دارد: سیستم آنتی اکسیدان فیزیولوژیک آندوژن که شامل گلوکاتیون، کاتالاز و آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز می باشد. راه دفاعی دیگر در مقابل آسیب های اکسیداتیو، آنتی اکسیدان های حاصل از منبع غذایی است. بهترین آنتی اکسیدان های شناخته شده، فلاونوئیدها و تانن ها هستند. (Jomova, Raptova et al. ۲۰۲۳).

طبق یافته ها مشاهده می شود که با تغییر فرهنگ مصرف رژیم غذایی و روش زندگی از سنتی به صنعتی میزان شیوع بیماری دیابت افزایش پیدا کرده است. رعایت رژیم غذایی و درمان های جایگزین علاوه بر کاهش هزینه درمان در بسیاری از موارد موجب پیشگیری و بهبود دیابت نوع دوم و در بعضی موارد بهبودی رضایت بخش برای بیماران دیابتی نوع اول می شود. هم اکنون داروهای متعددی جهت کاهش میزان قند خون بالا ارائه شده است ولی به دلیل عدم بهبودی کامل این بیماری با مصرف داروهای موجود، تمایل به استفاده از درمان های جایگزین و سنتی افزایش پیدا کرده است. در این میان نقش گیاهان دارویی با خواص کاهش دهنده قند خون در درمان بیماران دیابتی را نمی توان نادیده گرفت. (Dyńska, Kowalcze et al. ۲۰۲۳).

در این تحقیق اثرات آنتی اکسیدان های موجود در عصاره ولیک سیاه (*Crataegus elbursensis*) بر اندام کلیه موش صحرایی نر مسموم شده با استرپتوزوتوسین مورد مطالعه قرار خواهد گرفت.

۲. روش کار

۳۵۰ گرم میوه ولیک سیاه از گیاه ولیک با نام علمی (*Crataegus elbursensis*) از جنگل های سوادکوه از توابع مازندران جمع آوری شد. میوه های ولیک توسط دستگاه خشک کن به مدت ۵ روز به طور کامل خشک گردید و تا زمان عصاره گیری درون محفظه بسته و به دور از نور و رطوبت نگهداری شد. میوه های خشک شده با دستگاه آسیاب سه مرتبه به طور کامل پودر گردید. در هر مرتبه ۲۵ گرم پودر ولیک خشک شده به ۲۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد تا نسبت ۱ به ۸ پودر به حلال بر اساس دستور کار رعایت گردد. سپس محلول حاصل به مدت یکروز توسط دستگاه شیکر هم زده شد. پس از این مرحله، محلول اتانولی پودر ولیک دوبار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در حمام اولتراسونیک قرار داده شد تا فلاونوئیدها به خوبی از پودر ولیک استخراج و به درون محلول اتانول وارد گردد. در مرحله بعدی، محلول با کاغذ صافی دو بار صاف گردید و در نهایت ۱۵۰ میلی لیتر محلول صافی شده بدست آمد. محلول تهیه شده درون سه فالكون ۵۰ میلی لیتری ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ در دمای محیط قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ محلول رویی از هر فالكون جدا گردید و محلول به دست آمده درون بالن دستگاه روتاری ریخته شد. دمای دستگاه روتاری بر روی ۴۰ درجه سانتی گراد و فشار دستگاه بر روی ۱۷۵ میلی متر جیوه تنظیم شد. محلول به مدت یک ساعت روتاری شد و تا حد امکان دستگاه حلال اتانول را از محلول جداسازی کرد تا در نهایت ۸۰ میلی لیتر محلول تغلیظ شده به دست آمد.

به منظور خالص سازی محلول از لیپیدهای غیر ضروری و مواد زائد و تهیه عصاره غنی فلاونوئیدی، محلول حاصل توسط دکانتور، سه مرتبه هر بار با ۵۰ میلی لیتر کلروفرم شستشو داده شد؛ با توجه به این که چگالی کلروفرم از اتانول بیشتر است پس از تکان

دادن قیف جداکننده و بدون حرکت قرار دادن دکانتور در حالت عمودی، محلول اتانولی عصاره در بالای دکانتور و کلروفرم در پایین قرار گرفت و محلول اتانولی عصاره جدا گردید. در ادامه خالصسازی، محلول اتانولی چهار مرتبه هر بار با ۵۰ میلی لیتر اتیل استات شستشو داده شد و با توجه به بیشتر بودن چگالی محلول اتانولی نسبت به اتیل استات، محلول اتانولی در پایین دکانتور قرار می گیرد. در نهایت محلول بالایی که اتیل استات حاوی ترکیبات فلاونوئیدی و فنلها است جدا گردید. در مرحله آخر، ۱۲۰ میلی لیتر محلول اتیل استاتی به دست آمده به مدت یک ساعت در دمای ۴۰ درجه و فشار ۲۴۰ روتاری شد و سرانجام ۶۰ میلی لیتر محلول غلیظ تهیه شد. سپس این محلول تغلیظ شده درون ۸ پتری دیش ریخته شد و به مدت یک هفته در آون با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار گرفت تا به طور کامل خشک گردد. در پایان عصاره ی خشک شده توسط اسپاتول از درون پتری دیشها برداشته شد و مقدار ۸ گرم عصاره غنی فلاونوئیدی به دست آمد. این مقدار عصاره درون فالكون ۱۵ میلی لیتری ریخته شد و تا زمان گاواژ درون فریزر ۲۰ - نگهداری شد.

۲-۱-۲ تست های آنتی اکسیدان

۲-۱-۱ روش کار تست DPPH غلظت های مختلف عصاره

در این روش ۲ میلی گرم از عصاره ولیک، به ۱ میلی لیتر متانول اضافه شد و با دستگاه ورتکس به خوبی در آن حل گردید. سپس در تاریکی در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه الیزا خوانده شد. درصد فعالیت بازدارندگی مهار رادیکال آزاد DPPH با فرمول زیر محاسبه شد:

$$I = 100 \times [(A_0 - A) / A_0]$$

A₀: جذب شاهد

A : جذب نمونه

تمام سنجشها با سه مرتبه تکرار انجام شد و از داده ها میانگین گرفته شد.

۲-۲ روش کار تست FRAP

تهیه معرف کلروفریک ۲۰ میلی مولار: ۰,۰۵۴ گرم FeCl₂ در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد.

تهیه معرف ۱۰ میلی مولار TPTZ: ۰,۳۱ گرم TPTZ با محلول ۴۰ میلی مولار HCl به حجم ۱۰ میلی لیتر برسانیم.

تهیه بافر ۰,۳ مولار استات سدیم با pH=۳/۶: برای تهیه این بافر ۰,۴۰۸ گرم استات سدیم در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود. در مرحله بعد ۱,۶ میلی لیتر اسید استیک در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شود. سپس دو محلول فوق را داخل لیوان ریخته و حل کرده تا به pH= ۳/۶ برسد. در مرحله آخر ۳ محلول استات سدیم، معرف کلرید آهن، معرف TPTZ به ترتیب ۱:۱:۱۰ مخلوط شد.

۲-۳ گروه بندی موش ها

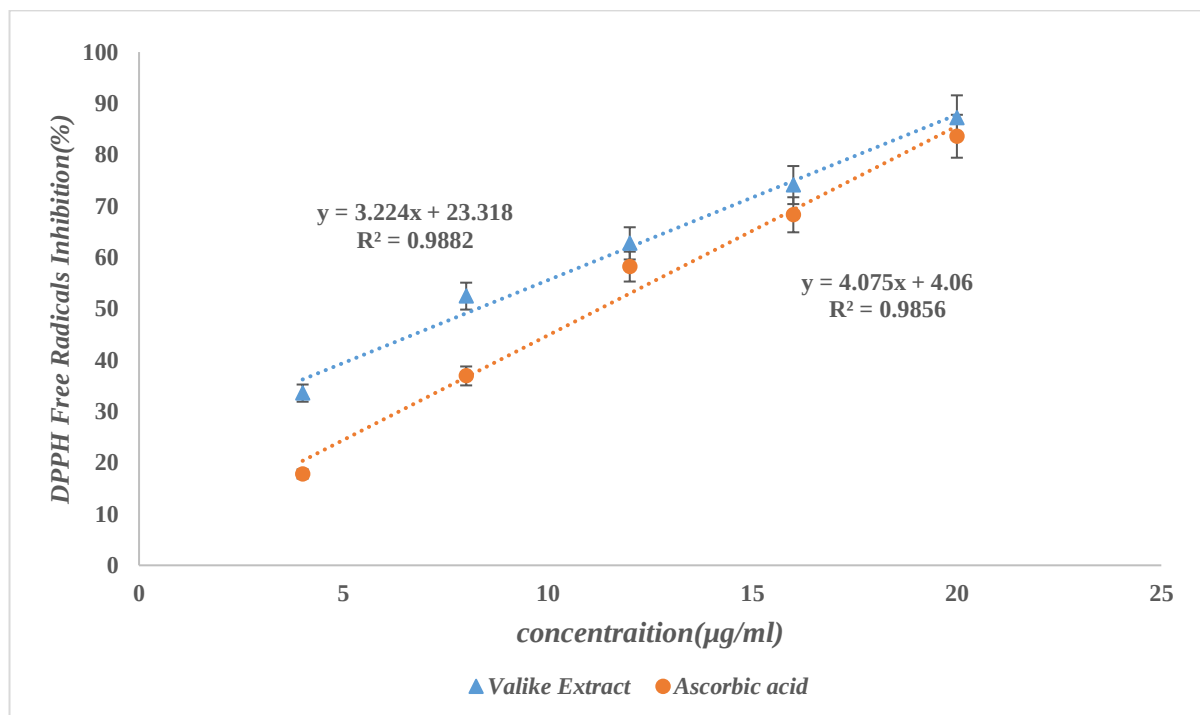
در این پژوهش تجربی، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ با نژاد ویستار در بازه وزنی ۱۶۰ تا ۲۳۰ گرم به ۵ گروه کنترل، کنترل مثبت، عصاره دز ۱۰۰ mg/kg، عصاره دز ۲۰۰ mg/kg و بیمار دسته بندی شد و هر گروه هشت تایی در یک کیج جداگانه به مدت یک هفته در اتاق حیوانات گروه زیست شناسی دانشگاه مازندران نگهداری شد تا با محیط جدید سازگار شوند. با توجه به پروتکل مقالات علمی معتبر، به منظور دیابتی کردن موشها، میبایست مقدار ۵۰ mg/kg استرپتوزتوسین به هر موش تزریق شد؛ با توجه به این که پس از یک هفته نگهداری موشها در اتاق حیوانات و تغذیه آنها، وزن موش ها به طور میانگین به ۲۳۰ گرم رسیده بود، به این ترتیب به هر موش باید مقدار ۱۱,۵ میلی گرم STZ تزریق میشد در نتیجه برای دیابتی کردن ۲۴ سر موش، مقدار ۰,۲۷ گرم استرپتوزتوسین در ۲,۵ میلی لیتر سالین فیزیولوژیک سرد حل گردید. به هر موش انتخابی برای گروههای بیمار، عصاره دز ۱۰۰ و عصاره دز ۲۰۰، بمقدار ۰,۱ میلی لیتر محلول STZ به صورت درون صفاقی تزریق شد تا موشها دیابتی شوند.

۳- نتایج و یافته ها

۳-۱ بررسی قدرت آنتی اکسیدانی عصاره ولیک سیاه

۳-۱-۱ آزمون مهار رادیکال های آزاد DPPH

در این روش برای مقایسه قدرت آنتی اکسیدانی عصاره ولیک سیاه از یک آنتی اکسیدان طبیعی به نام اسید آسکوربیک به عنوان استاندارد استفاده شده و نتایج بررسی ها در نمودار زیر آمده است.

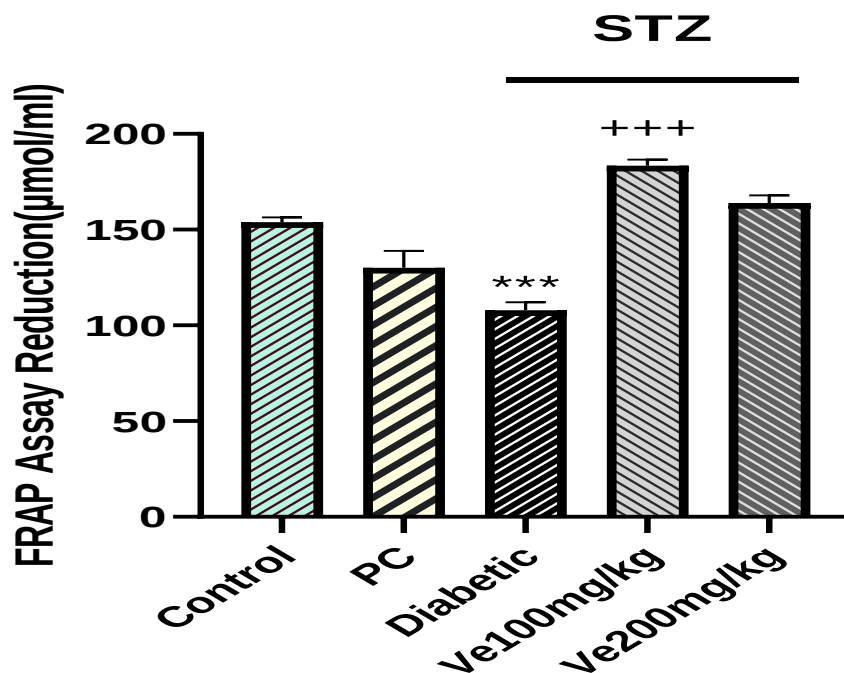


نمودار فعالیت و قدرت مهار عصاره ولیک سیاه و آسکوربیک اسید در برابر رادیکال های آزاد DPPH

به منظور ارزیابی فعالیت مهار رادیکالهای آزاد و مقایسه قدرت آنتی اکسیدانی عصاره ولیک مورد استفاده به عنوان دارو از برابر آسکوربیک اسید به عنوان نمونه استاندارد در مهار رادیکالهای آزاد DPPH استفاده شد، غلظتهای یکسان از نمونه های مورد سنجش تهیه گردید و درصد مهار رادیکالهای آزاد آنها نسبت به یکدیگر مقایسه شد. نتایج بدست آمده از این سنجش نشان می دهد که عصاره ولیک در هر ۵ غلظت مختلف دارای اثر آنتی اکسیدانی قوی می باشد که به صورت وابسته به دوز اثر می کند.

۳-۱-۲ فعالیت احیا کنندگی FRAP

وجود آنتی اکسیدان ها باعث کاهش یون Fe^{3+} به یون Fe^{2+} می شود که این کاهش الکترونی با تغییر رنگ از زرد به سبز همراه است. هرچه شدت رنگ حاصل بیشتر باشد، جذب بزرگتر بوده و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش می یابد. بررسی فعالیت احیا کنندگی در کلیه بر اساس نمودار زیر نشان داده شده است که گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری پیدا کرده است ($p < 0.001$). در حالیکه گروه تیمار با دز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم در مقایسه با بیمار افزایش پیدا کرده است ($p < 0.001$). ظرفیت آنتی اکسیدانی در گروه های تیمار به دلیل افزایش پراکسیداسیون و مهار آنتی اکسیدانی حاصل از فعالیت دارو های آنتی اکسیدانی افزایش را نشان داده است. که این نشان از اثر بخشی درمان بر روی فعالیت های کلیه موش دیابتی دارد.



$n = 5$, $(P < 0.001)$ *** در مقایسه با گروه کنترل و کنترل مثبت، $(p < 0.001)$ +++ در مقایسه با گروه بیمار

۴. بحث و نتیجه گیری

در مطالعه ما از میوه ولیک سیاه به عنوان آنتی اکسیدانی طبیعی و موثر با خواص آنتی اکسیدانی بالا برای درمان دیابت استفاده شد. عملکرد عصاره ولیک سیاه در کاهش شرایط دیابتی و قند خون در موش دیابتی شده با استرپتوزوتوسین نشان از موثر بودن

این عصاره در درمان دیابت داشت. نتایج ما نشان داد که استفاده از عصاره ولیک سیاه میتواند درمان موثر طبیعی و بدون عوارض جانبی برای بیماریهای ناشی از اکسیداسیون سلولی و بویژه دیابت باشد و به همین منظور میتوان از عصاره غنی این میوه به عنوان یک افزودنی طبیعی برای کاربرد در صنعت غذا و دارو استفاده کرد.

مراجع

Dyńska, D., et al. (۲۰۲۳). "Effect of the ketogenic diet on the prophylaxis and treatment of diabetes mellitus: a review of the meta-analyses and clinical trials." Nutrients ۱۵(۳): ۵۰۰

Esmailzadeh, M., et al. (۲۰۲۳). "Evaluation of different extraction methods on antioxidant compounds of dog-rose mountain, red hawthorn and black hawthorn (Mazandaran fruits)." Environmental Sciences (۱۳۲۴-۱۷۳۵) (۳) ۲۱

Jomova, K., et al. (۲۰۲۳). "Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging." Archives of toxicology ۹۷(۱۰): ۲۵۷۴-۲۴۹۹

Naaman, S. C. and G. L. Bakris (۲۰۲۳). "Diabetic nephropathy: update on pillars of therapy slowing progression." Diabetes Care ۴۶(۹): ۱۵۸۶-۱۵۷۴

Ruan, S., et al. (۲۰۲۳). "Nanomedicines based on trace elements for intervention of diabetes mellitus." Biomedicine & Pharmacotherapy ۱۶۸: ۱۱۵۶۸۴

Safapour, S., et al. (۲۰۱۸). "Extraction, dyeing, and antibacterial properties of crataegus elbursensis fruit natural dye on wool yarn." Fibers and Polymers ۱۹: ۱۴۳۴-۱۴۲۸

Salih, A.-H. M., et al. (۲۰۲۳). "The Probiotic Lactobacillus sakei Subsp. Sakei and Hawthorn Extract Supplements Improved Growth Performance, Digestive Enzymes, Immunity, and Resistance to the Pesticide Acetamiprid in Common Carp (Cyprinus carpio)." Aquaculture Nutrition ۲۰۲۳

Salmanian, S., et al. (۲۰۱۴). "Phenolic content, antiradical, antioxidant, and antibacterial properties of hawthorn (Crataegus elbursensis) seed and pulp extract." Journal of Agricultural Science and Technology ۱۶(۲): ۳۵۴-۳۴۳

Wachtel-Galor, S. and I. F. Benzie (۲۰۱۱). "Herbal medicine." Lester Packer, Ph. D.: ۱

الزامات اخلاقی نگارش مقاله

نویسنده / ارسال کننده مقاله خانم سحرگرگانی متعهد می شود:

- مقاله ارسالی حاصل کار پژوهشی ایشان (و همکاران) بوده و در مواردی که از دستاوردهای تحقیقاتی دیگران استفاده شده، مطابق ضوابط و رویه معمول، مشخصات منابع مورد استفاده درج شده است.
- مقاله ارسالی (یا ترجمه آن) و مقاله‌ای با همپوشانی قابل توجه با این مقاله قبلاً در هیچ مجله و یا کنفرانس ارائه نشده و به طور همزمان نیز در حال ارزیابی در مجله یا کنفرانس دیگری نیست.
- همه نویسندگان مقاله از کلیه محتویات علمی و نیز ترتیب قرارگیری نام و مشخصات و وابستگی شغلی خود در مقاله آگاهی و رضایت کامل دارند.
- چنانچه هر زمان خلاف موارد فوق و یا بروز هرگونه تقلب یا تخلف پژوهشی در رابطه با این مقاله اثبات شود، عواقب ناشی از آن متوجه نویسنده مقاله است و دبیرخانه کنفرانس مجاز است با ایشان (و همکاران) مطابق با ضوابط و مقررات رفتار نموده و هیچ گونه ادعایی قابل قبول نخواهد بود.

محل امضا

