

بررسی بیان ژن‌های حفاظت سلولی *TXNRD1* و *GCLC* پس از افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف

حسین مهرابی حبیب‌آبادی^۱، فاطمه امیری^۲، الهام مسلمی^۳، مهریار حبیبی رودکنار^۴، محمد علی جلیلی^۵

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به علت خصوصیات منحصر به فرد، سلول‌هایی ایده‌آل در زمینه‌های سلول درمانی و ژن درمانی می‌باشند. اما بقای کم آن‌ها پس از پیوند، استفاده از آن‌ها را محدود کرده است. هدف این مطالعه، بررسی بیان ژن‌های حفاظت سلولی شامل *GCLC*، *HO-1*، *TXNRD1*، *NQO1* پس از افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، MSCs بند ناف کشت داده شدند و پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *Nrf2* و پلاسمید فاقد ژن *Nrf2* با استفاده از ماده FuGENE HD به داخل این سلول‌ها ترانسفکت شدند. پس از اعمال استرس به سلول‌ها، RNA استخراج شده و cDNA ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های *Nrf2*، *NQO1*، *GCLC*، *HO-1*، *TXNRD1* با استفاده از نرم‌افزار ۳ Primer طراحی و بیان این ژن‌ها با روش RT-PCR بررسی شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار Image J2x و ANOVA کمی‌سازی و بررسی آماری گردید.

یافته‌ها

بیان *Nrf2* در MSCs متعاقب ترانسفکشن افزایش داشت ($p < 0/01$). افزایش بیان ژن‌های *GCLC* و *TXNRD1* نیز در سلول‌های ترانسفکت شده مشاهده شد ($p < 0/05$ و $p < 0/01$) ولی بیان ژن‌های *HO-1* و *NQO1* در این سلول‌ها نسبت به کنترل تغییری نداشت.

نتیجه‌گیری

افزایش بیان *Nrf2* موجب بیان *GCLC* و *TXNRD1* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی شده و به نظر می‌رسد بخشی از اثرات حفاظتی شناخته شده *Nrf2* تحت تاثیر بیان این ژن‌ها باشد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پروتئین *Nrf2* انسانی، پروتئین *TXNRD1* انسانی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۱۶

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی مولکولی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق - تهران - ایران

۲- PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- PhD زیست‌شناسی سلولی و مولکولی - استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق - تهران - ایران

۴- PhD زیست فن‌آوری پزشکی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۵- مؤلف مسئول: PhD شیمی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی:

۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

مقدمه

مشکلات و محدودیت‌های موجود در استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی، توجه محققین به استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ را افزایش داده است (۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغین هستند (۱).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، برای اولین بار در سال ۱۹۶۶ توسط پراکوا و فرایدانشترین طی جداسازی سلول‌های استخوانی از مغز استخوان موش شناسایی شدند (۲). این سلول‌ها، جمعیتی از سلول‌های بنیادی چندتوانه می‌باشند که از بافت‌هایی نظیر مغز استخوان، ماهیچه اسکلتی، مغز، بافت چربی، خون بندناف، خون محیطی و بافت‌های پیوندی پوستی جدا می‌شوند (۳). علی‌رغم تفاوت‌های مختصر، توانایی تکثیر و خودنوسازی طولانی مدت، ریخت‌شناسی دوکی و فیروبلاست مانند و توانایی تمایز به دودمان مزودرمی و حتی غیر مزودرمی از خصوصیات منحصر به فرد این سلول‌ها می‌باشند (۴). از طرفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توانایی فرار از سیستم ایمنی میزبان، خاصیت تعدیل ایمنی و سهولت تکثیر در آزمایشگاه، سلول‌های ایده‌آلی برای سلول درمانی هستند. به طوری که امروزه پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان آسیب‌های بافتی، انفارکتوس میوکارد، آسیب حاد کلیوی و سایر انواع بیماری‌ها مؤثر می‌باشد (۵-۷). ولی طی فرآیندهای جمع‌آوری، کشت و پردازش، آسیب‌های متعددی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی وارد می‌شود که بقا و عملکرد آن‌ها را در بدن کاهش می‌دهد. در برخی موارد یک روز پس از پیوند، کمتر از ۱٪ سلول‌های پیوند شده زنده باقی می‌مانند (۸، ۹). به کارگیری راهکارهای مناسب جهت افزایش مقاومت این سلول‌ها در برابر استرس‌های موجود، درصد موفقیت پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد شناخت و تقویت مکانیسم‌های حفاظتی این سلول‌ها، منجر به بقای بیشتر آن‌ها شود. یکی از راهکارهای مؤثر و قوی، دست‌ورزی ژنتیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با عوامل محافظت‌کننده سلولی شناخته شده می‌باشد (۹).

یکی از عوامل محافظت‌کننده سلولی (Cytoprotective)،

فاکتور نسخه‌برداری *Nrf2* (erythroid-derived 2)-like 2 Nuclear factor است. این فاکتور نسخه‌برداری بقای سلولی را در مواجهه با استرس‌های مختلف افزایش می‌دهد. *Nrf2* به طور طبیعی بیان شده و به پروتئین‌های سیتوپلاسمی متصل می‌شود و در اثر استرس‌های گوناگون، به هسته سلول رفته و موجب بیان ژن‌های متعددی مانند آنزیم‌های مؤثر در فرآیند آنتی‌اکسیدان و سم‌زدایی سلولی می‌شود. *Nrf2*، نقش مهمی در حفاظت علیه استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی ناشی از مواد شیمیایی دارد (۱۰-۱۳). تحت شرایط استرس، بیان *Nrf2* افزایش یافته و موجب رونویسی از ژن‌هایی می‌گردد که باعث افزایش مقاومت سلولی می‌شوند. از جمله این ژن‌ها *TXNRD1*، *GCLC*، *GSTs*، *HO-1* و *NQO1* هستند که اثرات سمیت‌زدایی و آنتی‌اکسیدانی داشته و در نهایت منجر به دفاع سلولی می‌شوند (۱۴-۱۸).

NQO1 (NAD(P) H dehydrogenase [quinone] 1)، ژن بیان‌کننده یک آنزیم اکسیدو ردوکتاز است که نقش مهمی در سم‌زدایی از کوئینون و مشتقات آن بر عهده دارد (۱۹). هم‌چنین این آنزیم باعث ثبات و پایداری P53 می‌شود و از سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند (۲۰).

ژن *HO-1* (هم اکسیژناز-۱)، موجب بیان آنزیم‌های القایی در شرایط استرس سلولی شده و این آنزیم مولکول اکسیدکننده هم (Heme) را تجزیه نموده و محصولات جانبی هم چون CO، بیلی‌روبین و Fe^{2+} را تولید می‌نماید (۲۱). از مهم‌ترین عملکردهای *HO-1* می‌توان به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان، آنتی‌آپوپتوتیک و ضدالتهابی اشاره نمود (۲۲، ۲۳).

ژن *TXNRD1* (Thioredoxin reductase 1)، ضمن عهده‌دار بودن نقش حیاتی در پاسخ بیولوژیک به استرس اکسیداتیو، از طریق کنترل فعالیت تیوردوکسین در کنترل تکثیر سلولی، بقای سلولی و آپوپتوز نیز دخیل می‌باشد (۲۴).

ژن *GCLC* (Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic)، آنزیم گلوتامات سیستئین لیگاز را رمزگذاری می‌کند. این آنزیم اولین عامل محدودکننده ساخت گلووتاتیون بوده و در

گرفت.

ترانسفکشن سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

در این مطالعه از پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *Nrf2* (pcDNA3.1-*Nrf2*) که در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران تولید و صحت آن تایید شده بود استفاده شد (۲۶). به منظور افزایش بیان *Nrf2*، حدود ۳۰۰ هزار سلول بنیادی مزانشیمی در پلیت ۶ خانه‌ای کشت داده شدند. جهت انجام ترانسفکشن و طی سری آزمایش‌های متعدد، نسبت‌های مختلف از غلظت DNA پلاسمیدی و ماده FuGENE HD (روش، آلمان) با یکدیگر مخلوط شدند. در نهایت مخلوط ۲ میکروگرم از DNA پلاسمیدی با ۴ میکرولیتر از ماده ترانسفکشن ذکر شده به اِزاء ۳۰۰ تا ۴۰۰ هزار سلول بنیادی مزانشیمی به عنوان مقدار بهینه جهت انتقال (ترانسفکشن) پلاسمید نو ترکیب pcDNA3.1-*Nrf2* و پلاسمید فاقد ژن *Nrf2* (به عنوان گروه کنترل) به سلول‌ها انتخاب شد. از آن جا که پلاسمید استفاده شده دارای نشانگر پروتئین سبز فلورسنت (GFP) نبود تا درصد و یا موفقیت ترانسفکشن شدن با استفاده از مشاهده سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت بررسی شود، طبق دستورالعمل کیت در زمان‌های مختلف پس از ترانسفکشن (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، بیان *Nrf2* در هر دو گروه سلولی ترانسفکشن شده با پلاسمید نو ترکیب و پلاسمید فاقد *Nrf2* با روش RT-PCR بررسی شد. از طرفی جهت القای بیان *Nrf2*، سلول‌های ترانسفکشن شده به مدت ۱ ساعت در معرض اشعه UV قرار گرفتند. پس از تعیین بهترین زمان ترانسفکشن که منجر به بیان بیشتر *Nrf2* شده بود، بیان ژن‌های *GCLC*، *NQO1*، *TXNRD1*، *HO-1* نیز با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

PCR ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR):

پس از ترانسفکشن سلول‌ها در زمان مناسب و اعمال استرس اشعه UV، مقدار RNA برابر از سلول‌های ترانسفکشن شده با پلاسمید نو ترکیب (*MSC-Nrf2*) و ترانسفکشن شده با پلاسمید فاقد ژن *Nrf2* (*MSC-V*) با استفاده از کیت استخراج RNA (اینویترژن، آلمان) و

پاسخ به استرس‌های سلولی دخیل است (۲۵).

ژن‌های توصیف شده از عوامل شناخته شده محافظت سلولی بوده و به عنوان ژن‌های فرودست *Nrf2* مطرح هستند. در مطالعه‌های دیگر اثر افزایش بیان *Nrf2* در افزایش مقاومت سلولی به شرایط استرس محیطی بررسی شده، اما تغییر بیان این ژن‌ها که احتمالاً به شناخت بهتر مکانیسم حفاظت کنندگی *Nrf2* کمک می‌کند، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (۲۶-۲۸).

با توجه به اطلاعات موجود و اهمیت این ژن‌ها در القای مقاومت سلولی، در این مطالعه بیان برخی از ژن‌های حفاظت سلولی مانند *GCLC*، *HO-1*، *TXNRD1*، *NQO1* پس از افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بررسی شد. به عبارت دیگر با بررسی بیان ژن‌های پایین دست *Nrf2* برخی از مکانیسم‌های احتمالی حفاظت سلولی *Nrf2* تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

آماده سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

این مطالعه از نوع تجربی بوده و جهت انجام آن از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف استفاده شد. این سلول‌ها در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران از نمونه بندناف جداسازی و تعیین خصوصیت شده بودند (۲۹). پاساژ سوم تا پنجم سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف از تانک اِزت خارج شده و پس از ذوب شدن در محیط کشت سلولی DMEM-Low Glucose (اینویترژن، آلمان) با ۱۰٪ FBS (اینویترژن، آلمان)، ۱٪ پنی سیلین و استرپتومایسین (اینویترژن، آلمان) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO_2 کشت داده شدند. از آن جا که خصوصیت تمایزی این سلول‌ها به سه رده استخوان، چربی و غضروف همانند مارکرهای سطحی آن‌ها قبلاً تایید شده بود، تنها خصوصیات ریخت شناسی MSC های تکثیر یافته در آزمایشگاه، مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور MSC های بند ناف در محیط کشت مذکور کشت داده شدند. ۵ روز بعد و پس از این که به صورت یک لایه سطح فلاسک را پوشانده، خصوصیات شکلی آن‌ها با میکروسکوپ نوری معکوس مورد بررسی و مشاهده قرار

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای اختصاصی طراحی شده با استفاده از وبگاه NCBI و نرم‌افزار Primer3 جهت تکثیر ژن‌های مورد مطالعه

ژن	آغازگر جلوپرونده (F)	آغازگر معکوس (R)	اندازه محصول
<i>β-actin</i>	GTGTTGAAGGTCTCAAACATGAT	TTCTTACAATGAGCTGCGTGTGG	۲۰۰ bp
<i>Nrf2</i>	GTTGGCAGATCCACTGGTTTCTG	GCGACGGAAAGAGTATGAGCTGG	۱۸۵ bp
<i>NQO1</i>	TCTCCAGGCCTTTCTTCCAT	CAGTATCCTGCCGAGTCTGT	۲۲۶ bp
<i>TXNRD1</i>	ACTCGGTAGCCCCAATTCAA	GGTCTCGGAGGAACATGTGT	۱۹۴ bp
<i>HO-1</i>	TTGTTGCGCTCAATCTCCTCCTC	ATGGAGCGTCCGCAACCCGAC	۲۱۰ bp
<i>GCLC</i>	GCGATAAACTCCCTCATCCA	ACCATCATCAATGGGAAGGA	۱۸۲ bp

طبق دستورالعمل استخراج گردید و کمیت RNA استخراج شده به وسیله دستگاه نانودراپ (اسپکتا، آمریکا) بررسی شد. پس از آن با مقادیر و غلظت‌های برابر از RNA استخراج شده از هر کدام از دو گروه ذکر شده، cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA (بایونیر، آمریکا) ساخته شد. پس از طراحی آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزارهای موجود مانند Primer3 و یا سایت NCBI، این آغازگرها بلاست شده و از نظر وجود ساختار ثانویه نیز در نرم‌افزار Genrunner مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). با ایجاد شرایط دمایی و زمانی مناسب توسط دستگاه ترموسایکلر (تاکارا، ژاپن)، واکنش PCR جهت بررسی بیان ژن‌های *Nrf2*، *TXNRD1*، *NQO1*، *GCLC* و *HO-1* انجام شد. به منظور بررسی صحت فرایندها و طبیعی‌سازی بیان ژن‌ها، بیان ژن بتا‌اکتین به عنوان ژن استاندارد نیز بررسی شد. پس از پایان واکنش PCR، مقدار برابر از محصولات بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. باندهای ایجاد شده توسط دستگاه ژل داک ترانس‌لومیناتور تصویربرداری شدند.

بررسی آماری و کمی‌سازی نتایج:

به منظور بهینه‌سازی شرایط ترانسفکشن و یا بررسی بیان ژن‌های مذکور با روش RT-PCR، آزمایش‌های متعدد با ایجاد شرایط مختلف انجام شد. پس از بهینه‌سازی و به دست آوردن بهترین شرایط ممکن، کلیه آزمایش‌ها اعم از ترانسفکشن و یا بررسی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR، به صورت سه تا پنج تایی در هر سری کار آزمایشگاهی به

طور مستقل انجام شدند. یک تصویر از بررسی بیان هر کدام از ژن‌ها به عنوان نمونه ارائه شده اما کمی‌سازی نتایج RT-PCR با استفاده از نرم‌افزار Image J 2x و تعیین میانگین و انحراف معیار شدت باندهای مشاهده شده در تصاویر گرفته شده از ژل آگارز (سه تا پنج تصویر) صورت پذیرفت. مقایسه آماری با استفاده از ANOVA انجام شده و اختلاف معنادار با ارزش p کمتر از ۰/۰۵ گزارش گردید.

یافته‌ها

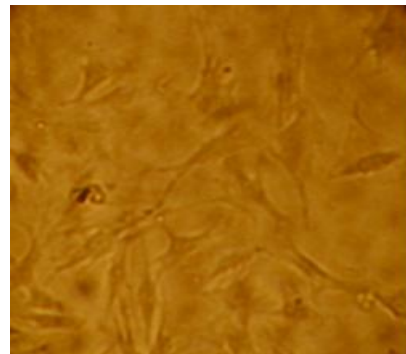
سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده فیبروبلاست شکل بودند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف موجود در سازمان انتقال خون ایران کشت داده شدند. مشاهدات میکروسکوپی مشخص کرد که این سلول‌ها دوکی شکل و شبه فیبروبلاستی هستند (شکل ۱). قابلیت تمایز سلول‌ها به سه رده‌ی چربی، استخوان و غضروف و هم چنین بیان مارکرهای سطحی مهم سلول‌های بنیادی مزانشیمی مانند CD90، CD105، CD29 و عدم بیان مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی خونساز مانند CD34 و CD45 قبلاً تأیید شده بود (۲۹).

بیان *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *Nrf2* افزایش داشت. پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *Nrf2* (pcDNA3.1-Nrf2) و پلاسمید فاقد ژن *Nrf2* با استفاده از FuGENE HD به درون سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت شدند. پس از انجام آزمایش‌های متعدد و بررسی بیان *Nrf2* با روش RT-PCR، بهترین زمان ترانسفکشن که منجر به افزایش بیان *Nrf2*

ترانسفکت شده با پلاسמיד نو ترکیب حاوی ژن *Nrf2* افزایش داشت.

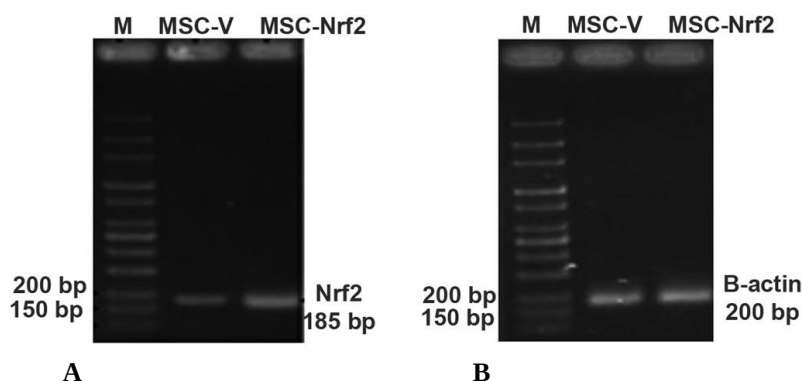
هم زمان با بررسی بیان ژن محافظت سلولی *Nrf2* در سلول‌های ترانسفکت شده و استرس دیده، بیان برخی از ژن‌های پایین دست *Nrf2* مانند *TXNRD1*، *NQO1*، *GCLC*، *HO-1* نیز در این سلول‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. پس از الکتروفورز محصول PCR و کمی‌سازی نتایج، مشخص شد که بیان ژن *TXNRD1* در گروه *MSC-Nrf2* (ترانسفکت شده با پلاسמיד *pcDNA3.1-Nrf2*) نسبت به گروه *MSC-V* (ترانسفکت شده با پلاسמיד فاقد ژن *Nrf2*) افزایش داشت ($p < 0.05$) (شکل A۳). از طرفی همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، بیان ژن *GCLC* متعاقب افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های دریافت‌کننده پلاسמיד نو ترکیب افزایش داشته و گروه *MSC-Nrf2* این ژن را بیشتر از گروه *MSC-V* بیان کردند ($p < 0.01$) (شکل B۳). از آن جا که بیان تمامی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از یک cDNA از هر کدام از دو گروه ترانسفکت شده با پلاسמיד نو ترکیب حاوی ژن *Nrf2* و یا پلاسמיד فاقد ژن *Nrf2* بررسی شد، تصویر بررسی بیان ژن بتا کتین بر روی این cDNA ها در یک بار آزمایش ارایه شده است. اما در هر سری انجام PCR، بتا کتین به عنوان کنترل داخلی جهت پایش درست عمل کردن کل سیستم در حین انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت.



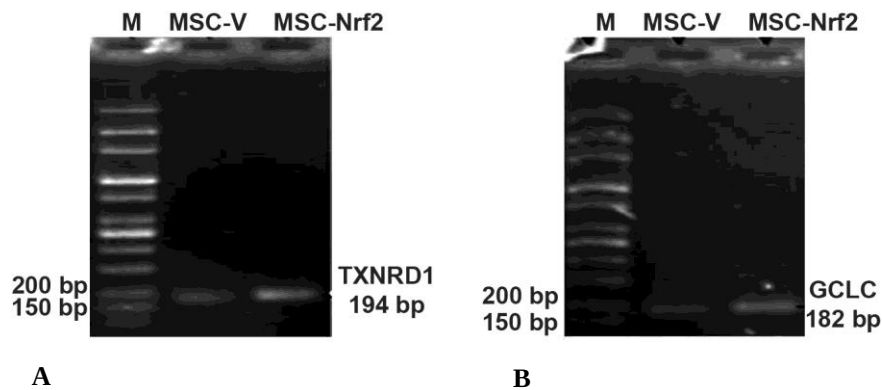
شکل ۱: مشاهده میکروسکوپی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف ۵ روز پس از کشت آن‌ها. سلول‌ها ظاهر دوکی و شبه فیبروبلاست داشتند (بزرگنمایی $\times 200$)

شود ۷۲ ساعت تعیین شد. نتایج کمی‌سازی با نرم‌افزار Image J 2x، بیانگر افزایش بیان ژن *Nrf2* در زمان ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن و بعد از القای استرس UV در گروه سلولی ترانسفکت شده با پلاسמיד نو ترکیب (*MSC-Nrf2*) نسبت به گروه سلولی ترانسفکت شده با پلاسמיד فاقد ژن *Nrf2* بود ($p < 0.01$) (شکل A۲). ژن بتا کتین به عنوان ژن استاندارد و به منظور اطمینان از درستی فرآیندهای انجام شده انتخاب شد، نتایج نشان داد که هر دو گروه این ژن را یکسان بیان کرده و اختلاف معناداری بین بیان بتا کتین در دو گروه تحت مطالعه وجود ندارد (شکل B۲).

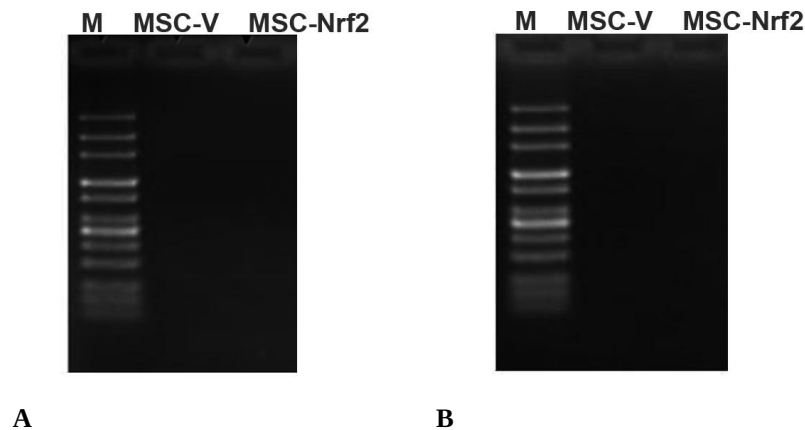
بیان ژن‌های *GCLC* و *TXNRD1* در سلول‌های



شکل ۲- A: بررسی بیان ژن *Nrf2* در دو گروه سلولی تحت مطالعه با روش RT-PCR. M: مارکر (100 bp) DNA، ردیف *MSC-V*، *MSCs*: ترانسفکت شده با پلاسמיד خالی، ردیف *MSC-Nrf2*، *MSCs* ترانسفکت شده با پلاسמיד *pcDNA3.1-Nrf2*. گروه *MSC-Nrf2* این ژن را بیشتر بیان کرد ($p < 0.01$). B: بررسی بیان ژن بتا کتین (β -actin) در دو گروه سلولی تحت مطالعه. بیان بتا کتین در دو گروه اختلاف معنادار نداشت.



شکل ۳- A: بررسی بیان ژن *TXNRD1* در دو گروه سلولی تحت مطالعه با روش RT-PCR. M: مارکر (۱۰۰ bp) DNA، ردیف MSC-V: MSCs: ترانسفکت شده با پلاسمید *pcDNA3.1-Nrf2*. گروه MSC-Nrf2 این ژن را بیشتر بیان کرد ($p < 0.05$). B: بررسی بیان ژن *GCLC* در دو گروه سلولی تحت مطالعه با روش RT-PCR. M: مارکر (۱۰۰ bp) DNA، ردیف MSC-V: MSCs: ترانسفکت شده با پلاسمید خالی، ردیف MSC-Nrf2: MSCs: ترانسفکت شده با پلاسمید *pcDNA3.1-Nrf2*. گروه MSC-Nrf2 این ژن را بیشتر بیان کرد ($p < 0.01$).

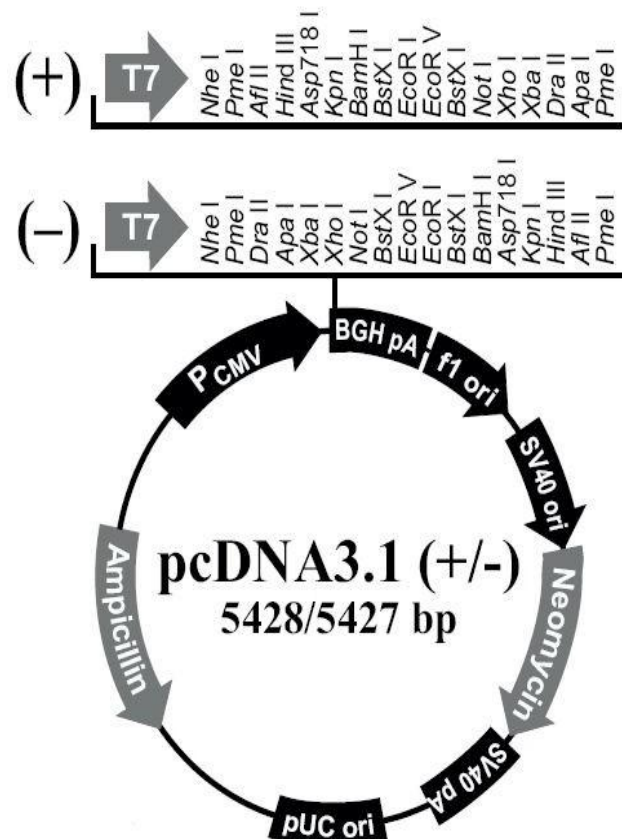


شکل ۴- A: بررسی بیان ژن *HO-1* در دو گروه سلولی تحت مطالعه با روش RT-PCR. M: مارکر (۱۰۰ bp) DNA، ردیف MSC-V: MSCs: ترانسفکت شده با پلاسمید خالی، ردیف MSC-Nrf2: MSCs: ترانسفکت شده با پلاسمید *pcDNA3.1-Nrf2*. هر دو گروه این ژن را بیان نکردند. B: بررسی بیان ژن *NQO1* در دو گروه سلولی تحت مطالعه با روش RT-PCR. M: مارکر (۱۰۰ bp) DNA، ردیف MSC-V: MSCs: ترانسفکت شده با پلاسمید خالی، ردیف MSC-Nrf2: MSCs: ترانسفکت شده با پلاسمید *pcDNA3.1-Nrf2*. هر دو گروه این ژن را بیان نکردند.

افزایش بیان *Nrf2* بر بیان ژن‌های *HO-1* و *NQO1* تأثیری نداشت:

پس از افزایش بیان *Nrf2*، بیان ژن‌های *HO-1* و *NQO1* نیز مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی بیان ژن *HO-1* و الکتروفورز محصول PCR و کمی‌سازی نتایج، هیچ گونه باندی در هر دو گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC-) *Nrf2* و *MSC-V* مشاهده نشد و بیان ژن *HO-1* در MSC ترانسفکت شده با پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *Nrf2* با

بیان آن در MSC ترانسفکت شده با پلاسمید فاقد ژن *Nrf2* تفاوتی نداشت. ژن *NQO1* نیز در دو گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان نشد و بیان ژن *NQO1* در دو گروه تحت مطالعه اختلاف معناداری را نشان نداد (شکل ۴ A و B). در کل با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که متعاقب افزایش بیان *Nrf2* برخی از ژن‌های زیر دست آن مانند *TXNRD1*، *GCLC* نیز بیان بیشتری داشته ولی بیان ژن‌هایی مانند *HO-1*، *NQO1* تغییری ندارد.



شکل ۵: نقشه پلاسمید pcDNA3.1 استفاده شده در این مطالعه

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل جداسازی آسان و توانایی تمایز مناسب، کاربردهای مختلفی در پزشکی دارند (۶، ۷). با این وجود طی فرآیندهای جمع‌آوری، کشت و پردازش، آسیب‌های متعددی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی وارد می‌شود که بقا و عملکرد آن‌ها را کاهش می‌دهد (۸). بنابراین مطالعه‌های متعددی در زمینه افزایش بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی صورت گرفته است (۳۲-۳۰). در این مطالعه بیان ژن *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف افزایش داده شد. به دلیل اهمیت زیاد این ژن که از ژن‌های اصلی دخیل در حفظ سلول‌ها در شرایط استرس است، بیان آن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزایش داده شد. ژن *Nrf2* بیان‌کننده پروتئین *Nrf2* می‌باشد که یک فاکتور نسخه‌برداری حساس به اکسیداسیون و احیا است و به عنوان فاکتور رونویسی به عناصر تنظیمی که در فرادست بسیاری از ژن‌های

محافظت‌کننده سلولی قرار دارند، متصل شده و منجر به بیان این ژن‌ها می‌شود. پروتئین *Nrf2* در مقایسه با دیگر ژن‌های مؤثر در حفاظت از سلول این مزیت را دارد که منجر به افزایش بیان هم زمان مجموعه‌ای از ژن‌های محافظت‌کننده سلولی می‌گردد (۱۸-۱۴، ۱۲، ۱۰).

در این مطالعه از MSCs بند ناف استفاده شد. نمونه بند ناف یک نمونه قابل دسترس با نمونه‌گیری آسان و غیر تهاجمی است که از نظر اخلاقی نیز مشکلی ندارد (۳۳). از طرفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت بند ناف دارای قدرت تکثیر و کلونی‌زایی بیشتر بوده و خاصیت چندتوانی بیشتری دارند (۳۵، ۳۴). در مطالعه اخیر جهت افزایش بیان ژن *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف، از حامل پلاسمیدی (pcDNA3.1) و ماده (FuGENE HD) استفاده شد. pcDNA3.1 یک شاتل وکتور است به این معنی که امکان کلونینگ آن در سیستم پروکاریوتی و بیان آن در سیستم یوکاریوتی وجود دارد

(۳۶). نقشه پلاسمید pcDNA3.1 در شکل ۵ ارائه شده است. استفاده از حامل پلاسمیدی (به جای حامل ویروسی) نگرانی از واکنش‌های ایمنی غیر اختصاصی و یا جهش‌زایی را به همراه ندارد (۳۷). ماده FuGENE HD باعث افزایش درصد انتقال DNA به داخل سلول شده و بر روی تکثیر و تمایز سلولی اثر منفی ندارد (۳۸).

نتایج مطالعه بیانگر افزایش بیان ژن‌های *TXNRD1* و *GCLC* (از مجموعه ژن‌های پایین دست *Nrf2*) متعاقب افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های ترانسفکت شده بود. اما افزایش بیان *Nrf2* بر بیان دو ژن *HO-1* و *NQO1* اثری نداشت. در این مطالعه تغییر بیان ژن‌ها فقط به روش RT-PCR بررسی شد و در نهایت با استفاده از نرم‌افزار Image J2x نتایج کمی‌سازی شد. هر چند به منظور بررسی میزان بیان ژن‌ها بهتر است از روش‌های کمی مانند Real Time PCR با استفاده از رنگ فلورسنت سایر گرین و یا مواد دیگر استفاده شود اما محدودیت‌های زمانی و مالی موجب عدم استفاده از روش‌های تاییدی بیشتر در بررسی بیان این ژن‌ها شد که این مورد از مهم‌ترین محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد.

محمدزاده و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که افزایش بیان ژن *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش بیان *SOD1&2* (Superoxide desmutase1&2) در این سلول‌ها و افزایش مقاومت سلولی و کاهش آپوپتوز آن‌ها می‌شود (۲۶). آن‌ها از وکتور ویروسی جهت انتقال ژن *Nrf2* به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استفاده کردند. به نظر می‌رسد در مطالعه وی استفاده از وکتور ویروسی باعث افزایش درصد انتقال ژن و افزایش بیان بیشتر *Nrf2* در سلول‌های تحت مطالعه نسبت به تحقیق اخیر شده است. در مطالعه‌های مختلف از وکتورهای ویروسی و غیر ویروسی جهت آلوده کردن سلول‌های هدف به سازه حاوی ژن استفاده می‌شود. استفاده از وکتورهای ویروسی مانند رتروویروس‌ها، آدنوویروس‌ها و لنتی ویروس‌ها مرسوم می‌باشد. اما کاربرد آن‌ها همیشه با نگرانی از ورود ژن به ژنوم، ایجاد عفونت، ایجاد پاسخ ایمنی نسبت به وکتور ویروسی و ایجاد سرطان همراه بوده است (۳۸-۴۰).

لوونن در سال ۲۰۰۷ با استفاده از وکتور ویروسی بیان *Nrf2* را در سلول‌های عضله صاف عروقی افزایش داد و چنین گزارش کرد که این سلول‌ها در بیماری عروقی که با التهاب و استرس اکسیداتیو زیادی همراه است، مقاومت سلولی بیشتری داشته و کمتر آسیب می‌بینند (۲۷). در مطالعه دیگر کائو و همکاران از افزایش بیان *Nrf2* به منظور توانمندسازی سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو استفاده کردند (۲۸). در مطالعه آن‌ها از رده سلولی نروبلاستومایی استفاده شده بود که بعد از افزایش بیان *Nrf2* در این سلول‌ها، مقاومت آن‌ها در برابر استرس ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن ارتقا یافت. در مطالعه اخیر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌عنوان سلول‌های اولیه چند توان که می‌توانند کاربردهای بیشتری داشته باشند استفاده شد. رده‌های سلولی، سلول‌های اولیه نبوده و یک سری دست‌ورزی‌های مختلف بر آن‌ها اعمال شده است.

در مطالعه‌های دیگر بیان شده است که *Nrf2* موجب افزایش نسخه‌برداری ARE شده و بدین وسیله باعث تقویت بیان آنزیم‌های حفاظت‌کننده سلولی و آنتی‌اکسیدان وابسته به ARE از جمله *HO-1*، *SOD1&2*، *GCLC*، *GPx*، *NQO1* می‌شود (۴۳-۴۱). در مقابل نتایج مطالعه اخیر نشان داد که افزایش بیان *Nrf2* بر بیان *NQO1* اثری نداشت. استفاده از سلول‌های بنیادی مختلف جدا شده از بافت‌های گوناگون و به کارگیری روش‌های مختلف جهت افزایش بیان *Nrf2* با درصد اختصاصیت و حساسیت متفاوت، می‌تواند از دلایل احتمالی تفاوت در نتایج گزارش شده باشد.

در کل، نتایج مطالعه اخیر تا حدودی در راستای مطالعه‌های موجود بوده و با افزایش بیان برخی ژن‌های محافظت سلولی همراه بود که به نظر می‌رسد در نهایت باعث افزایش مقاومت سلولی و کاهش مرگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مراحل سلول درمانی شود. البته انجام مطالعه‌های بیشتر، بررسی کمی تغییرات بیان ژن‌ها با روش‌هایی مانند Real Time PCR، بررسی بیان این ژن‌ها در سطح پروتئین و بررسی میزان بقا و مقاومت سلولی گروه ترانسفکت شده با وکتور نوترکیب در مواجهه با استرس‌های مختلف به منظور تایید افزایش مقاومت آن‌ها

می‌تواند تکمیل کننده این مطالعه باشند.

مطالعه‌ها و تحقیقات آتی و جامع است.

نتیجه‌گیری

افزایش بیان *Nrf2* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجب بیان بیشتر ژن‌های *GCLC* و *TXNRD1* در این سلول‌ها شده و به نظر می‌رسد بخشی از نقش حفاظت سلولی *Nrf2* تحت تاثیر بیان این ژن‌ها باشد که نیازمند

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق می‌باشد که در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون انجام پذیرفته است.

References :

- 1- Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140(1): 138-43.
- 2- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(4): 568-84.
- 3- Schwartz L, Maitournam H, Stolz JM, Ho Ba Tho MC, Halphen B. Growth and cellular differentiation: a physcobiological conundrum? The example of the hand. *Med Hypotheses* 2003; 61(1): 45-51.
- 4- Armesilla-Diaz A, Elvira G, Silva A. p53 regulates the proliferation differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2009; 315(20): 3598-610.
- 5- Zhang W, Su X, Gao Y, Sun B, Yu Y, Wang X, *et al.* Berberine protects mesenchymal stem cells against hypoxia-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull* 2009; 32(8): 1335-42.
- 6- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, *et al.* Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004; 109(12): 1543-9.
- 7- Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, *et al.* Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 2005; 66(3): 543-51.
- 8- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105(1): 93-8.
- 9- Haider HK and Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: Combining preconditioning approach with stem cell transplantation. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(4): 554-66.
- 10- Yates MS, Tran QT, Dolan PM, Osburn WO, Shin S, McCulloch CC, *et al.* Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis* 2009; 30(6): 1024-31.
- 11- Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem* 2003; 278(14): 12029-38.
- 12- Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, *et al.* Activation of Nrf2- antioxidant signaling attenuates NFkappaB inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(11): 1485-9.
- 13- Reisman SA, Yeager RL, Yamamoto M, Klaassen CD. Increased Nrf2 activation in livers from keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species. *Toxicol Sci* 2009; 108(1): 35-47.
- 14- Jin W, Wang H, Ji Y, Zhu L, Yan W, Qiao L, *et al.* Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to acute lung injury after traumatic brain injury in mice. *Exp Biol Med* 2009; 234(2): 181-9.
- 15- Lee J-M and Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 2004; 37(2): 139-43.
- 16- Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, Nilles T, Biswal S, Trush MA, *et al.* Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Arch Biochem Biophys* 2006; 454(1): 7-15.
- 17- Homma S, Ishii Y, Morishima Y, Yamadori T, Matsuno Y, Haraguchi N, *et al.* Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(10): 3423-32.
- 18- Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, *et al.* Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J* 2005; 19(9): 1061-6.
- 19- Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, Knight D, Sadakane Y, Isoyama K, *et al.* The association of a distinctive allele of NAD(P)H: quinone oxidoreductase With Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemias with MLL fusion genes in Japan. *Haematologica* 2005; 90(11): 1511-5.
- 20- Fagerholm R, Hofstetter B, Tommiska J, Aaltonen K, Vrtel R, Syrjäkoski K, *et al.* NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 NQO1*2 genotype (P187S) is a strong prognostic and predictive factor in breast cancer. *Nat Gene* 2008; 40(7): 844-53.
- 21- Katori M, Buelow R, Ke B, Ma J, Coito AJ, Lyer S, *et al.* Heme oxygenase-1 overexpression protects rat

- hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation* 2002; 73(2): 287-92.
- 22- Ke B, Buelow R, Shen XD, Melinek J, Amersi F, Gao F, *et al.* Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway. *Hum Gene Ther* 2002; 13(10): 1189-99.
- 23- DeBruyne LA, Magee JC, Buelow R, Bromberg JS. Gene transfer of immunomodulatory peptides correlation with heme oxygenase-1 induction and enhanced allograft survival. *Transplantation* 2000; 69(1): 120-8.
- 24- Papp LV, Lu J, Holmgren A. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(7): 775-806.
- 25- Gipp JJ, Chang C, Mulcahy RT. Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human liver gamma-glutamylcysteine synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185(1): 29-35.
- 26- Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, Amirzadeh N, Jahanian-Najafabadi A, Roushandeh AM, *et al.* Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. *Cell Stress Chap* 2012; 17(5): 553-65.
- 27- Levonen AL, Inkala M, Heikura T, Jauhiainen S, Jyrkkanen HK, Kansanen E, *et al.* Nrf2 gene transfer induces antioxidant enzymes and suppresses smooth muscle cell growth *in vitro* and reduces oxidative stress in rabbit aorta *in vivo*. *Arter Thromb Vas Biol* 2007; 27(4): 741-47.
- 28- Cao TT, Ma L, Kandpal G, Warren L, Hess JF, Seabrook GR. Increased nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2 activity protects SH-SY5Y cells against oxidative damage. *J Neurochem* 2005; 95(2): 406-17.
- 29- Amiri F, Halabian R, Salimian M, Shokrgozar MA, Soleimani M, Jahanian-Najafabadi A, *et al.* Induction of multipotency in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells cultivated under suspension conditions. *Cell Stress Chaperones* 2014; 19(5): 657-66.
- 30- Zhang J, Chen G, Wang Y, Zhao J, Duan H, Liao L, *et al.* Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Whartons Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Chin Med J* 2012; 125(19): 3472-8.
- 31- Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, *et al.* Bcl-2 Engineered MSCs Inhibited Apoptosis and Improved Heart Function. *Stem Cells* 2007; 25(8): 2118-27.
- 32- Zeng B, Lin G, Ren X, Zhang Y, Chen H. Overexpression of HO-1 on mesenchymal stem cell promotes angiogenesis and improves myocardial function in infarcted myocardium. *J Biomed Sci* 2010; 17(1): 80-91.
- 33- Venugopal P, Balasubramanina S, Majumdar AS, Tam. Isolation, characterization, and gene expression analysis of Whartons Jelly-derived mesenchymal stem cell under xenofree culture conditions. *Stem Cells Clon Adv App* 2011; 4(1): 39-50.
- 34- Fong CY, Chak LL, Biswas A, Tan JH, Gauthaman K, Chan WK, *et al.* Human Whartons Jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev Rep* 2011; 7(1): 1-16.
- 35- Troyer DL, Weiss ML. Concise review: Whartons Jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008; 26(3): 591-9.
- 36- Bloom MV, Freyer GA, Micklos DA. *Laboratory DNA Science*. California: Benjamin Cummings; 1996. p. 298-320.
- 37- Phillips AJ. The challenge of gene therapy and DNA delivery. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53(9): 1169-74.
- 38- Hoelters J, Ciccarella M, Drechsel M, Geissler C, Gölkan H, Böcker W, *et al.* Nonviral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J Gene Med* 2005; 7(6): 718-28.
- 39- Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5(12): 1571-84.
- 40- Peister A, Mellad JA, Wang M, Tucker HA, Prockop DJ. Stable transfection of MSCs by electroporation. *Gene Ther* 2004; 11(2): 224-8.
- 41- Keum YS, Owuor ED, Kim BR, Hu R, Kong AN. Involvement of Nrf2 and JNK1 in the activation of antioxidant responsive element (ARE) by chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Pharm Res* 2003; 20(9): 1351-6.
- 42- Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and C-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD (P) H: quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 93(25): 14960-69.
- 43- Sun XH, Erb A, Murphy TH. Coordinate regulation of glutathione metabolism in astrocytes by Nrf2. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326(2): 371-7.

Original Article

Overexpression of *Nrf2* in umbilical cord-derived mesenchymal stem cells upregulating cytoprotective genes, *TXNRD1* and *GCLC*

Mehrabi Habibabadi H.¹, Amiri F.², Moslemi E.¹, Habibi Roudkenar M.², Jalili M.A.²

¹Ismaic Azad University of East Tehran Branch, Tehran, Iran

²Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Due to the unique criteria, mesenchymal stem cells (MSCs) are the ideal cells for cell therapy and gene therapy. However, the low survival of MSCs after transplantation has limited their application. This study aimed to evaluate the expression of cytoprotective genes including *NQO1*, *TXNRD1*, *HO-1*, *GCLC* following the overexpression of *Nrf2* in MSCs.

Materials and Methods

In this experimental study, umbilical cord-derived MSCs were cultured and recombinant vectors containing *Nrf2* and empty vectors were transfected into MSCs using FuGENE HD. After exposure of the cells to stress, RNA extraction and cDNA generation were performed. Using Primer3 software, specific primers were designed for *Nrf2*, *NQO1*, *TXNRD1*, *HO-1* and *GCLC* genes and the expression of these mentioned genes was evaluated by RT-PCR. The results were quantified and analyzed statistically utilizing Image J software and ANOVA.

Results

The expression of *Nrf2* was up-regulated in MSCs after transfection ($p < 0.01$). Overexpression of *TXNRD1* and *GCLC* was observed in transfected cells ($p < 0.05$ and $p < 0.01$); however, the expression of *NQO1* and *HO-1* did not change in the transfected group in comparison to the control ($p > 0.05$).

Conclusions

Overexpression of *Nrf2* resulted in the overexpression of *TXNRD1* and *GCLC* in MSCs and might be explained by the fact that a part of the known *Nrf2* cytoprotective mechanisms is controlled by the expression of these genes.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, NRF2 protein, human, TXNRD1 protein, human

Received: 20 Jan 2015

Accepted: 6 Jun 2015

Correspondence: Jalili M.A., PhD of Medicinal Chemistry. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052155; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: m.jalili@ibto.ir