

# خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۱۰ شماره ۳ پاییز ۹۲ (۲۶۶-۲۵۵)

مقاله پژوهشی

## پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمال با غلظت‌های بهینه $H_2O_2$ به منظور افزایش بقا و مقاومت در برابر استرس‌های اکسیداتیو

حامد بشیری نهنچی<sup>۱</sup>، مهریار حبیبی رودکنار<sup>۲</sup>، راحله حلیان<sup>۳</sup>، مهدی جلیلی<sup>۴</sup>، محمدعلی جلیلی<sup>۵</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

مطالعه‌ها بر روی سلول‌های مزانشیمال پیوندی نشان داده‌اند که شرایط نامساعد محیط بافت از جمله حضور رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایتوکاین‌های التهابی، قسمت اعظم آن‌ها را در روزهای ابتدایی پس از پیوند از بین می‌برد. به منظور رفع این مشکل، در این مطالعه اثر پیش‌شرطی کردن سلول‌های مزانشیمال با  $H_2O_2$  به منظور افزایش مقاومت آن‌ها در برابر شرایط اکسیداتیو کشته شده بررسی شد.

#### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول بنیادی مزانشیمي مغز استخوان با استفاده از فایکول جداسازی و پاساز چهارم انتخاب شد. سلول‌های پاساز چهارم با غلظت‌های مختلف  $H_2O_2$  طی زمان‌های متفاوت، مجاور و انکوبه شدند. سپس سلول‌ها ریکاور شده و در شرایط معمول کشت سلول قرار گرفتند. در نهایت سلول‌های پیش شرطی شده تحت شرایط کشته قرار گرفتند. پس از انجام این مراحل، میزان سلول‌های زنده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. پس از انجام مراحل پیش شرطی و القای آپوپتوز، به منظور بررسی تاثیر پیش شرطی کردن در قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی و بنیادی بودن آن‌ها، سلول‌های پیش شرطی شده، به رده سلولی استئوسیت تمایز داده شدند.

#### یافته‌ها

نتایج نشان دادند که پیش شرطی کردن سلول‌های مزانشیمال با  $H_2O_2$  موجب افزایش بقا و مقاومت آن‌ها در برابر استرس‌های اکسیداتیو کشته در مقایسه با سلول‌های کنترل پیش شرطی نشده، می‌شود بدون این که تاثیر منفی در قابلیت تمایز آن‌ها داشته باشد.

#### نتیجه‌گیری

پیش شرطی کردن سلول‌های مزانشیمال با غلظت‌های بهینه  $H_2O_2$ ، بقا آن‌ها را در برابر استرس‌های اکسیداتیو افزایش داده و ممکن است منجر به پیشبرد کارایی درمان سلولی شود.

**کلمات کلیدی:**  $H_2O_2$ ، پیش شرطی کردن ایسکمیک، آپوپتوز، سلول‌های استروممال مزانشیمال چند قوه

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۳

- ۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- PhD بیوتکنولوژی پژوهشی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۳- دانشجوی دکتراي بیوتکنولوژی - مریي مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج) - تهران - ایران
- ۴- دکتراي عمومي دامپيشكى - دانشگاه آزاد اسلامي واحد کرج - کرج - ایران
- ۵- مؤلف مسؤول: PhD شيمي داروبي - استاديار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستي: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

۴۵۶

منظور سلول درمانی به اثبات رسیده است. در این روش سلول را با غلاظت های بهینه عوامل مختلف مانند  $H_2O_2$  یا فقر غذایی، به طور دوره ای مواجه می کنند که باعث می شود بیان ژن های بقا و محافظت کننده سلولی در سلول افزایش یابد، سلول را در برابر عوامل زیانبار در محیط پیوند حفظ کنند و بقای سلول پیوندی به میزان زیادی افزایش یابد که در نتیجه آن کارایی پیوند سلول بنیادی به میزان بسیار زیادی افزایش می یابد. یکی از مزیت های مهم این روش، ایمن بودن آن است که در آن سلول بنیادی از نظر ژنتیکی دست ورزی نمی شود و این که می توان این روش را بدون خطر در طب بالینی نیز استفاده کرد. با توجه به بررسی های صورت گرفته، در این مطالعه از پیش شرطی کردن سلول های بنیادی مزانشیمال با غلاظت های بهینه  $H_2O_2$ ، به عنوان یک استراتژی درمانی جدید و ایمن با هدف افزایش بقای MSCs پس از مواجهه با استرس های اکسیداتیو کشته شده استفاده گردید.

### مواد و روشها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

آن تی بادی های مورد استفاده جهت بررسی های فلوسایتومتریک شامل؛ CD 105-PE ، CD 73 (ALCAM)-PE ، CD 44-FITC ، CD 271-FITC و CD 34-FITC ، CD 90-FITC (داکو - دانمارک) بودند.

تهیه غلاظت های مختلف  $H_2O_2$  :

مولاریته استوکی که برای تهیه غلاظت های مختلف  $H_2O_2$  مورد استفاده قرار گرفت، برابر  $M\text{--}M/8$  بود. غلاظت هایی که برای پیش شرطی کردن مورد نیاز بودند به صورت میکرومولار بودند. بنابراین این استوک باید با استفاده از PBS (بافر نمکی) رقیق می شد تا به غلاظت های مورد نظر مرسید.

تهیه محلول تریپان بلو :

۴ میلی گرم پودر تریپان بلو را در ۱ میلی لیتر آب مقطر

سلول های بنیادی مزانشیمال (MSCs)، سلول های استروموای غیر هماتوپوتیک هستند که قادر به تمایز و شرکت در بازسازی بافت های مزانشیمال از قبیل استخوان، غضروف، عضله و چربی می باشند<sup>(۱)</sup>. امروزه سلول های بنیادی مزانشیمال به یک هدف امید بخش در خصوص سلول درمانی و ژن درمانی برای بیماری های مختلف و نیز مهندسی بافت تعديل شده اند. به عنوان مثال در زمینه پیوند سلول های بنیادی هماتوپوتیک (HSC)، سلول های بنیادی مزانشیمال موجب پیشرفت و بهبود پیوند HSCs و تسریع در بازسازی بافت خونساز می شوند. هم چنان با توجه به قابلیت تعديل کنندگی سیستم ایمنی، موجب درمان GVHD حاد می گردد. با این وجود به علت شرایط زیان بار محیط گیرنده پیوند از جمله نبود اکسیژن، فقر غذایی و نبود عروق تغذیه کننده، وجود رادیکال های آزاد اکسیژن، افزایش سایتوکاین های التهابی و عوامل دیگر، همگی باعث مرگ زودرس قسمت اعظم این سلول ها در روزهای ابتدایی پس از پیوند می شوند که به موجب آن میزان کارایی درمان سلولی بسیار پایین تر از حد انتظار است<sup>(۲)</sup>. بنابراین لازم است برای افزایش کارایی درمان مؤثر، راه کاری ارایه شود تا سلول های بنیادی را در برابر این شرایط سخت مقاوم کرده و مدت بقای این سلول ها را در محیط پیوند افزایش دهد. برای نیل به این هدف، مطالعه های زیادی در خصوص دست ورزی ژنتیکی MSCs به وسیله ژن های بقا و ضد آپوپتوزی و دیگر عوامل انجام شده ولی به علت خطر جهش زایی، از دیدگاه ایمن بودن این روش هنوز مورد تردید است و کاربرد بالینی پیدا نکرده است. یکی از روش هایی که در طی چند سال اخیر توجه بسیار ویژه ای به آن شده است، استفاده از پیش شرطی کردن (preconditioning) می باشد که اثرات بسیار سودمندی در محافظت سلولی دارد<sup>(۳)</sup>.

در پیش شرطی کردن از عوامل مختلفی می توان استفاده کرد، از قبیل فاکتور های رشد، عوامل استرس زا مانند  $H_2O_2$ ، هیپوکسی، لیپوپلی ساکارید (LPS) و شوک حرارتی، انواع سایتوکاین ها و کموکاین ها، مواد دارویی و دیگر موارد که سودمندی هر کدام از آن ها در رده های سلولی مختلف به

و پس از تریپسینه کردن به فالکن منتقل شدند و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. پس از سانتریفیوژ کردن، مایع رویی را دور ریخته و به ازای هر  $10^3 - 10^4$  سلول در هر میکرولیتر محیط، ۵ میکرولیتر از آنتی بادی های مونوکلونال مربوطه افزوده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در تاریکی انکوبه شدند. در انتهای ۱۰۰ میکرولیتر محلول پارافرمالدئید به محلول حاوی سلول و آنتی بادی اضافه شد و نتایج توسط دستگاه فلوسایتو مترا آنالیز گردید.

مراحل پیش شرطی کردن سلول های بنیادی مزانشیمال با  $H_2O_2$  ابتدا در ۲ پلیت ۹۶ خانه ای، تعداد ۱۲۰۰۰ سلول در هر خانه پلیت ریخته و به محیط کشت *DMEM Low Glucose* حاوی ۱۰٪ FBS و آنتی بیوتیک اضافه شد. سپس پلیت به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد  $CO_2$  دار منتقل و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از این مدت تعدادی از سلول ها با غلظت های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰  $\mu M$  از ماده  $H_2O_2$  مجاور شده و مابقی سلول ها به عنوان کنترل باقی ماندند. پلیت ها به انکوباتور منتقل شدند تا زمان انکوباسیون را طی کنند. یکی از پلیت ها به مدت ۱۲ ساعت و پلیت دیگر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، سلول ها ریکاور شده و در نهایت تحت شرایط کشندگی (غلظت های  $500 \mu M$  و  $300 \mu M$  ماده  $H_2O_2$ ) قرار گرفتند.

سنجرش درصد بقای سلولی با استفاده از آزمون *MTT* پس از اتمام مراحل پیش شرطی کردن و القای آپوپتوز، محیط چاهک ها خارج شد و ۱۵ میکرولیتر *MTT* (آمریکا، سیگما) به همراه ۹۰ میکرولیتر از محیط *Glucose DMEM Low* به همراه ۳۷ درجه سانتی گراد و  $0.5\% CO_2$  و دور از نور نگهداری شد. سپس ۹۰ میکرولیتر از محیط چاهک ها خارج و ۱۰۰ میکرولیتر *DMSO* (آلمان، مرک) به همراه ۲۵

حل نمودیم. محلول تهیه شده از صافی عبور داده شد و برای ممانعت از رشد قارچ ها، چند قطره سدیم آزاید به محلول اضافه گردید.

تهیه محلول *MTT*:

۵ میلی گرم از پودر *Thiazolyl blue tetrazolium bromide* را در ۱ میلی لیتر *PBS* حل نمودیم.

کشت سلولی:

مقدار ۱۰ میلی لیتر نمونه آسپیراسیون مغز استخوان یک اهداکننده سالم (با کسب رضایت)، به وسیله متخصص مربوطه در مرکز خون و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی گرفته شد و بعد از انتقال نمونه به لوله های حاوی ضد انعقاد هپارین، تحت شرایط استریل در درجه حرارت ۲-۸ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه مرکز تحقیقات انتقال خون ایران منتقل شد. به طور خلاصه، سلول های تک هسته ای که سلول های مزانشیمال نیز جزو این دسته از سلول ها هستند، با استفاده از فایکول (سوئد، آمرشام بیوساینس) و روش گرادیانت غلظت جداسازی و در محیط کشت اختصاصی *DMEM-Low Glucose* (آمریکا، سیگما) با ۱۰٪ FBS (آمریکا، اینویتروژن)، ۱٪ پنی سیلین و ۱٪ استریپومایسین (ایران، سیناژن) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۰.۵٪  $CO_2$  انکوبه شدند.

دو روز پس از کشت اولیه، سلول های غیر چسبنده به وسیله تعویض محیط کشت حذف شدند اما سلول های *MSCs* مزانشیمال به کف فلاسک چسبیدند. در نهایت حاصل از پاساز چهارم جهت مطالعه مورد نظر فراهم شدند. به منظور تایید سلول های بنیادی مزانشیمال جدا شده در مراحل قبل، پس از رشد سلول ها در محیط کشت اختصاصی، خصوصیات مورفو لوژیکی (شکل ظاهری) سلول ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس و هم چنین حضور مارکرهای سطحی اختصاصی سلول های بنیادی مزانشیمال به وسیله فلوسایتو مترا مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین شاخص های سطحی *MSCs* به وسیله فلوسایتو مترا: ابتدا *MSCs* را با *PBS* (آمریکا، اینویتروژن) شستشو داده

می باشد(شکل ۲).



شکل ۱: سلول‌های بنیادی مزانشیمال جدا شده از مغز استخوان  
سلول‌ها پس از گذشت ۷ روز از پاساژ اول

ارزیابی کاهش مرگ سلولی در سلول‌های پیش شرطی  
شده با  $H_2O_2$  با استفاده از تریپان بلو و MTT:  
به منظور تعیین میزان سلول‌های زنده بعد از قرار گرفتن  
تحت شرایط کشندگی، سلول‌ها با تریپان بلو رنگ‌آمیزی  
شدن(جدول ۱).

همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بقای  
سلول‌هایی که با محدوده غلظت بین  $\mu M$  ۵-۱۵ از  $H_2O_2$   
پیش شرطی شده بودند، در مقایسه با سلول‌های کنترل  
(بدون پیش شرطی) در مواجهه با دوز کشندگی  $\mu M$  ۳۰۰  
و  $\mu M$  ۵۰۰ از  $H_2O_2$ ، تقریباً به طور متوسط به میزان چهار  
برابر افزایش یافت. لازم به ذکر است که هیچ گونه تفاوتی  
در نتایج به دست آمده از انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۱۲  
 ساعت با انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت و هم  
چنین نتایج حاصل از کشندگی سلول‌ها با غلظت  $\mu M$  ۳۰۰  
و  $\mu M$  ۵۰۰ از  $H_2O_2$ ، مشاهده نشد. اما از غلظت‌های  
 $\mu M$  ۵۰۰ از  $H_2O_2$  به بالا، میزان مرگ در سلول‌های پیش  
شرطی شده و سلول‌های کنترل یکسان بوده و بیش از ۸۰٪  
سلول‌ها دچار مرگ شدند. هم چنین میزان بقای سلولی  
پس از پیش شرطی کردن با  $H_2O_2$  با آزمایش MTT بررسی  
شد(نمودار ۱). درصد بقای سلول‌های پیش شرطی شده  
با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار  $H_2O_2$  در قایسه  
با سلول‌های کنترل، به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته  
است. میانگین و انحراف معیار سلول‌های کنترل و MSC  
تیمار شده حدود  $1/04 \pm 98$  بود.

میکرولیتر از بافر سورنسن به هر چاهک اضافه شد. در  
نهایت میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر  
اندازه گیری شد.

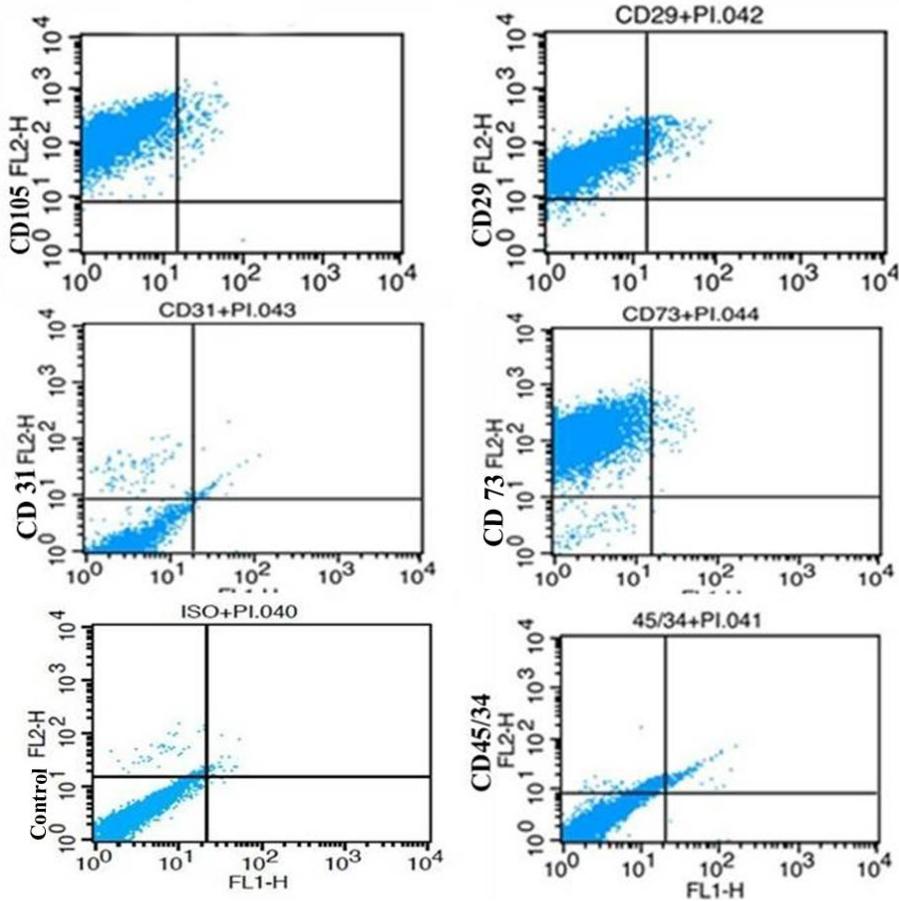
تحلیل آماری و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS با در نظر گرفتن خطای معیار(SEM) و  $p < 0.001$  و  $p < 0.05$  و  $p < 0.01$  انجام گردید. تمام مراحل آزمایش‌های فوق به صورت دوتایی(دابلیکیت) انجام شد.  
تمایز سلول‌های MSC که تحت مراحل پیش شرطی با  $H_2O_2$  قرار گرفته بودند، به رده‌های سلولی استخوان (اوستئوبلاست)، بررسی میزان تاثیر پیش شرطی کردن بر روی قدرت تمایز سلول‌های MSC با استفاده از کیت‌های تمایز سلولی و رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی بر روی سلول‌های MSC که تحت مراحل پیش شرطی کردن قرار گرفته بودند و سلول‌های کنترل(MSC معمولی) انجام شد.

تمایز سلول‌های MSC که تحت مراحل پیش شرطی با  $H_2O_2$  قرار گرفته بودند، به رده سلولی چربی(آدیپوسیت):  
پس از طی مراحل پیش شرطی کردن در MSCs این سلول‌ها به همراه سلول‌های MSC معمولی، با استفاده از روش‌های ذکر شده، به رده سلولی چربی تمایز داده شدند، پس از ۷ روز رنگ‌آمیزی با٪ HCS LipidTOXTM Green Neutral Lipid صورت گرفت.

## یافته‌ها

تایید حضور مارکرهای سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمال با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی و دستگاه فلوسایتومتری:

پس از جداسازی سلول‌ها و کشت در محیط کشت اختصاصی، سلول‌های رشد کرده از لحاظ مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های جدا شده از لحاظ مورفولوژی مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمال بودند(شکل ۱). پس از مشاهدات میکروسکوپی، حضور آنتی‌بادی‌های موجود در سطح سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. وجود مارکرهای سطحی CD105، CD29 و CD73 و عدم حضور مارکرهای CD31 و CD34 تاییدکننده سلول‌های مزانشیمال CD45

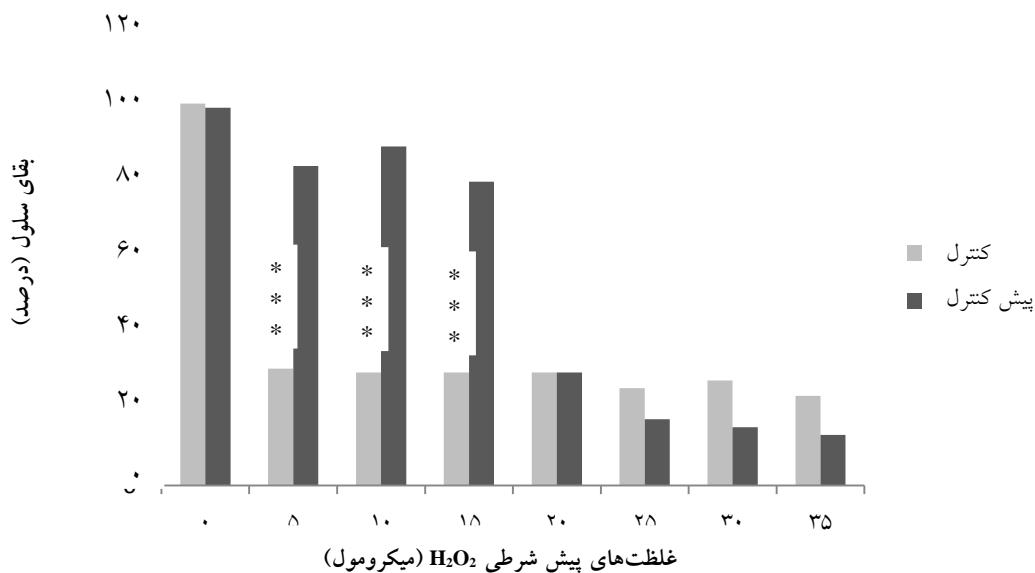


شکل ۲: بررسی مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمال. وجود مارکرهای سطحی CD29 ، CD105 و CD73 و عدم حضور مارکرهای CD34، CD31، CD45 تایید کننده سلول‌های مزانشیمال می‌باشد.

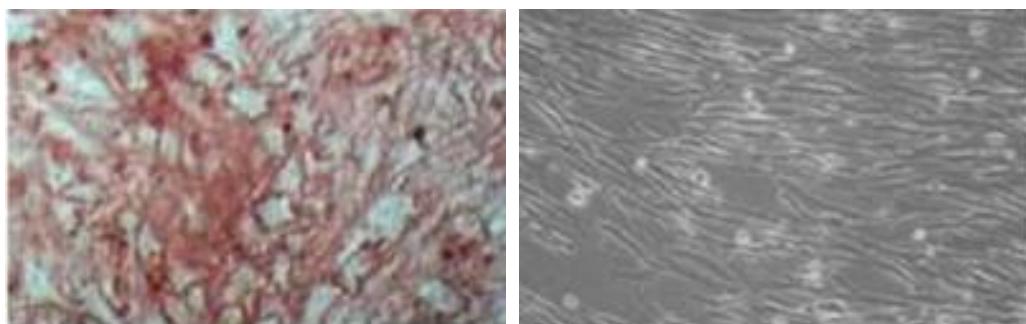
جدول ۱: بررسی میزان مرگ سلول پس از تیمار با  $H_2O_2$  با استفاده از تریپان بلو

غلهت‌های پیش‌شرطی $H_2O_2$ (بر حسب $\mu M$ )	۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۴۰، ۳۰، ۲۵ ۸۰، ۶۰، ۵۰
درصد سلول‌های مرده در سلول‌های پیش‌شرطی شده*	۲ ± ۰/۵	٪ ۱۵ ± ۰/۸۹	٪ ۱۲ ± ۰/۰۵	٪ ۱۸ ± ۱/۰۵	۶۸ ± ۲/۵	٪ ۸۵ ± ۲/۳
درصد سلول‌های مرده در سلول‌های کنترل*	۲ ± ۰/۵	٪ ۷۹ ± ۰/۳۴	٪ ۷۸ ± ۰/۳۷	٪ ۷۹ ± ۰/۲۵	٪ ۷۸ ± ۰/۳۰	٪ ۸۰ ± ۰/۴۵

همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بقای سلول‌هایی که با محدوده غلهت بین  $5-15 \mu M H_2O_2$  پیش‌شرطی شده بودند در مقایسه با سلول‌های کنترل(بدون پیش‌شرطی) در مواجهه با دوز کشنندگی  $300 \mu M H_2O_2$  تقریباً به طور متوسط به میزان چهار برابر افزایش یافت.

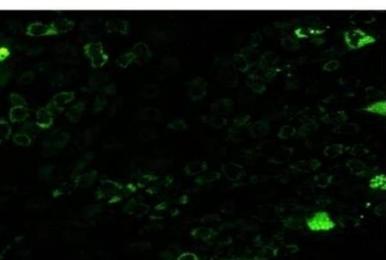


نمودار ۱: میزان بقای سلول با استفاده از MTT: محور افقی نشان‌دهنده غلظت‌های پیش شرطی  $H_2O_2$  و محور عمودی درصد بقای سلول است. میزان دوز کشنندگی ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت، Mean  $\pm$  SD،  $p < 0.001$  (\*\*\*) همان طور که در نمودار مشخص است درصد بقای سلول‌های پیش شرطی شده با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار  $H_2O_2$  در مقایسه با سلول‌های کنترل (در همان غلظت‌ها) به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. میانگین و انحراف معیار سلول‌های کنترل و MSC تیمارشده حدود  $98 \pm 104$  بود.



تمایز به رده استخوانی: B:

کنترل: A:



تمایز به رده چربی: C:

شکل ۳: تمایز سلولی. پس از طی مراحل پیش شرطی با  $H_2O_2$ ، سلول‌های پیش شرطی شده از نظر قابلیت تمایز به رده استخوانی مورد ارزیابی قرار گرفتند که همان گونه که در تصویر مشخص است، پیش شرطی کردن MSCs تغییری در روند تمایز سلولی نداشته و این سلول‌ها به سلول‌های رده مورد نظر تمایز پیدا کردند.

مطالعه‌های دیگری ظرفیت تمایزی MSCs مغز استخوان را در *in vivo* و *in vitro* به سلول‌های عصبی، سلول‌های عضله اسکلتی و کاردیومیوسیت‌ها نشان دادند(۵-۸). با این وجود سلول‌های بنیادی پیوندی نمی‌توانند در محیط ایسکمیک پیوند که سرشار از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایتوکاین‌های التهابی می‌باشد، به مدت زیادی دوام بیاورند و در همان روزهای ابتدایی قسمت اعظم سلول‌های بنیادی دچار مرگ سلولی می‌شوند که کارایی‌شان را در درمان سلولی بسیار محدود می‌کند(۹). در این رابطه، توما و همکارانش گزارش کردند، کمتر از ۴۴٪ از MSCs در طی ۴ روز بعد از پیوند به قلب موش‌های SCID، بقای مطلوب را داشتند(۱۰). هم چنین کو و همکارانش اشاره داشتند که بیش از ۹۳٪ از میوبلاست‌های عضله اسکلتی، ۲ روز بعد از پیوند دچار مرگ سلولی می‌شوند(۱۱). هم چنین در مطالعه‌ای بر روی انسان، پاگانی و همکارانش گزارش کردند در پیوند اتلولوگ میوبلاست‌های عضله اسکلتی به قلب ایسکمیک بیماران، کمتر از ۱٪ سلول‌های پیوندی زنده بودند(۱۲).

عوامل متعددی در مرگ زودرس MSCs در ریز محیط پیوندی نقش دارند. در همین رابطه ژو و همکارانش در طی آزمایشاتی به این نتیجه رسیدند که استرس‌های اکسیداتیو و آسیب ایسکمی (فقر غذایی به همراه هایپوکسی) از دلایل اصلی آپوپتوز MSCs در روزهای ابتدایی پس از پیوند می‌باشند(۱۳). با این وجود هاگنز علاوه بر استرس‌های اکسیداتیو و آسیب ایسکمی، پاسخ‌های التهابی و اینمنی موضعی را نیز از دلایل اصلی مرگ زودرس سلول‌های پیوندی می‌دانست(۱۴). با توجه به اهمیت موضوع، M ژانگ و روی در پایان مطالعه‌های شان به این نتیجه رسیدند که عامل موفقیت در افزایش کارایی پیوند MSCs، در ارتباط با ظرفیت بقای MSCs و نیز مقاومت شان به عوامل آسیب‌رسان موجود در ریز محیط پیوندی می‌باشد(۱۵). در این رابطه هایدر مهم‌ترین عامل عدم موفقیت پیوند MSCs را بقای پایین سلول‌های پیوندی می‌داند و برای افزایش کارایی و موفقیت پیوند، افزایش بقای MSCs به وسیله عوامل محافظت‌کننده سلولی را ضروری می‌داند(۸). بنابراین برای

نتایج تمایز سلول‌های MSC و سلول‌های MSC پیش‌شرطی شده با  $H_2O_2$ ، به رده سلولی استخوان (اوستئوبلاست): پس از طی مراحل پیش‌شرطی کردن در سلول‌های MSC، این سلول‌ها به همراه سلول‌های MSC معمولی، با استفاده از روش‌های ذکر شده، به رده سلولی استخوانی تمایز داده شدند و پس از ۲۱ روز، رنگ‌آمیزی آلیزارین رد S٪ صورت گرفت. نتایج بیانگر آن است که سلول‌های MSC که تحت مراحل پیش‌شرطی قرار گرفتند، همانند سلول‌های کنترل می‌توانند به رده سلولی استخوانی تمایز یابند و پیش‌شرطی کردن تغییری در خاصیت تمایزی سلول‌های MSC به رده استخوانی ایجاد نمی‌کند(شکل ۳). نتایج تمایز سلول‌های MSC و سلول‌های MSC پیش‌شرطی شده با  $H_2O_2$ ، به رده‌های سلولی چربی (آدیپوسیت) و غضروف پس از طی مراحل پیش‌شرطی کردن در MSCs این سلول‌ها به همراه سلول‌های MSC معمولی، با استفاده از روش‌های ذکر شده، به رده سلولی چربی تمایز داده شدند، پس از ۷ روز Rnگ‌آمیزی LipidTOXTM Green Neutral Lipid ۱۱HCS صورت گرفت. نتایج بیانگر آن است که سلول‌های MSC که تحت مراحل پیش‌شرطی قرار گرفتند، همانند سلول‌های کنترل می‌توانند به رده چربی تمایز یابند. به عبارت دیگر پیش‌شرطی کردن تاثیری در خاصیت چند ظرفیتی بودن MSC ندارد و احتمالاً بیانگر کاربردی بودن این سلول‌ها برای مطالعه‌های *in vivo* می‌باشد.

## بحث

امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمال به عنوان یک هدف امید بخش در زمینه سلول درمانی و ژن درمانی برای بیماری‌های مختلف و نیز مهندسی بافت مطرح شده‌اند و اخیراً در تعدادی از موارد از جمله پیوند، کاربردهای بالینی از آن گزارش شده است. به طوری که در سال ۱۹۹۹ وقتی برای اولین بار ماکینو و همکارانش در آزمایش‌های *in vitro* ظرفیت تمایزی MSCs به سلول‌های عضله قلبی (کاردیومیوسیت‌ها) را گزارش کردند، به یک باره تحقیقات در زمینه سلول درمانی و مهندسی بافت به طرز شگفت‌انگیزی توسعه پیدا کرد(۴). در همین راستا

آزمایشگاهی به منظور محافظت قلب، داس و همکارانش در سال ۲۰۰۶ و نیز سوزوکی و همکارانش در سال ۲۰۰۴، طی مطالعه‌هایی که انجام دادند مشاهده کردند پیش شرطی کردن با استفاده از ایسکمی مختصر و دوره‌ای، اندازه ناحیه سکته دیده شده عضله قلبی را به وسیله کاهش مرگ آپوپتوزیک و نکروتیک می‌وسیت‌ها به مقدار زیادی کاهش می‌دهد (۲۳-۲۵). روسوا و همکارانش در سال ۲۰۰۸ طی مطالعه‌هایی که انجام دادند، مشاهده کردند که پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسان (MSCs) با هایپوکسی منجر به افزایش تحرک و نیز بهبود پتانسیل درمانی MSCs می‌شود (۲۶). زیشان پاشا و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در آزمایش‌هایی که انجام دادند به این نتیجه رسیدند که پیش شرطی کردن MSCs با SDF-1α (Stromal-derived factor-1α)، باعث افزایش بقای سلولی و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال به می‌وسیت‌ها در طی پیوند به قلبی که دچار انفارکتوس شده می‌شوند (۱۷). در سال ۲۰۱۲، ون ولتون و همکارانش با پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمال به مغز مدل‌های نوزاد حیوانی که دچار آسیب ایسکمی شده بودند، موفق شدند تا اندازه ناحیه آسیب دیده را کاهش داده و موجب بهبود عملکرد مغز شوند. آن‌ها این طور نتیجه گرفته‌اند که سلول‌های مزانشیمال در پاسخ به نیازهای محیط ایسکمیک مغز با ترشح فاکتورهای رشد متعدد، سایتوکاین‌ها و سایر مولکول‌های بیوکتیو، فرآیندهای ترمیمی را تنظیم می‌کنند (۲۷).

با توجه به این که نتایج بسیاری از مطالعه‌ها حاکی از این است که پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی با استفاده از عوامل مختلف نظیر  $H_2O_2$ ، هایپوکسی، عوامل شیمیایی و فاکتورهای رشد موجب افزایش مقاومت و بقای سلول‌های پیوندی در محیط ایسکمیک بافت می‌شود و علاوه بر ایجاد مقاومت در سلول‌ها، خطرات ناشی از دستورزی ژنتیکی را نیز ندارد، در این مطالعه ما نیز به بررسی تاثیرات پیش شرطی کردن سلول‌ها با  $H_2O_2$  پرداختیم (۲۸-۳۰).

در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمال را در *in vitro* با غلظت‌های پایین  $H_2O_2$  در فواصل زمانی کوتاه مواجه کردیم، سپس سلول‌های پیش شرطی شده را در

افزایش کارابی، درمان مؤثر نیاز است تا سلول‌های بنیادی را در برابر این شرایط سخت مقاوم کرده و مدت بقای این سلول‌ها را در محیط پیوند افزایش دهیم. برای نیل به این هدف، مطالعه‌های زیادی در خصوص دستورزی ژنتیکی MSCs به وسیله ژن‌های بقا و ضد آپوپتوزی و دیگر عوامل انجام شده و می‌شود ولی به علت خطر جهش‌زاوی، از دیدگاه ایمن بودن این روش هنوز مورد تردید است و کاربرد بالینی پیدا نکرده است. یکی از روش‌هایی که در طی چند سال اخیر توجه بسیار ویژه‌ای به آن شده است، استفاده از روش پیش شرطی کردن با عوامل مختلف از قبیل هایپوکسی، فاکتورهای رشد و دیگر عوامل می‌باشد که اثرات بسیار سودمندی در محافظت سلولی دارد و به این ترتیب می‌توان تا حد زیادی به افزایش اثر بخشی پیوند کمک کرد. استفاده از پیش شرطی کردن به منظور پیوند سلول‌های بنیادی، یک روش بسیار مؤثر است و اثرات بسیار قوی در محافظت سلولی دارد (۱۶). موری و همکارانش در سال ۱۹۸۶ اولین پیشگامان این روش بودند که نشان دادند مواجهه کوتاه مدت به طور دوره‌ای با استفاده از پیش شرطی کردن با ایسکمی، منجر به این می‌شود که قلب مقاومت زیادی در برابر ایسکمی کشنده داشته باشد و بعد از آن پیش شرطی کردن به عنوان یک روش مؤثر و بسیار قوی به منظور محافظت سلولی مطرح شد. افضل و همکارانش در سال ۲۰۰۷، کوی و همکارانش در سال ۲۰۰۷، و سوزوکی و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که اثرات محافظت سلولی پیش شرطی کردن با ایسکمی را می‌توان به وسیله روش‌های مختلف دیگر از قبیل استفاده از عوامل دارویی، شوک حرارتی، تعديل و اصلاح ژنتیکی سلول‌ها به منظور افزایش بیان فاکتورهای رشد و مولکول‌های مسیر بقای سلولی و در معرض قرار دادن سلول‌ها با فرا صوت (Ultrasound) نیز انجام داد (۱۷-۱۹). گورک و همکارانش در سال ۱۹۹۶، مولیک و همکارانش در سال ۱۹۹۸ و نیز یلون و همکارانش در سال ۲۰۰۳ به این نتیجه رسیدند که پیش شرطی کردن با ایسکمی دوره‌ای خفیف، تحمل بافت‌های بدن مانند عضلات اسکلتی و قلبی را در برابر ایسکمی کشنده بسیار افزایش می‌دهد (۲۰-۲۲). در روش‌های

غلظت‌های بهینه شده عوامل اکسیدان قرار دادیم تا از این طریق استرسی به سلول‌ها وارد کرده باشیم که نه تنها برای آن‌ها آسیب‌رسان و کشنده نمی‌باشد، بلکه از طریق القای مکانیسم‌های گوناگون نظری فعال کردن ژن‌های آنتی‌آپوپتویک، القای بیان فاکتورهای رشد و مهار ژن‌های آپوپتویک در سلول‌ها سبب ایجاد مقاومت در آن‌ها و افزایش بقای آن‌ها می‌شود. تاکنون مسیرهای انتقال سیگنالی که به وسیله پیش شرطی کردن ایسکمیک شروع می‌شود و در فعال‌سازی مسیرهای مختلف پروتئین‌های بقای سلولی نقش دارد گزارش شده است. گورک و همکارانش در سال ۱۹۹۶، ژو و همکارانش در سال ۲۰۰۱ و هازنلوی و همکارانش در سال ۲۰۰۶ آن‌ها را شناسایی کردند که عبارتند از پروتئین کینازهای C، A و G که جزو خانواده MAPK و BMK1 (JNK، P38 و Erk1/2)، فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز(P13K) آبشار P13k-Akt و مسیر JAK-STAT می‌باشند(۲۲، ۳۱).

در مقایسه با مقاوم کردن سلول‌ها از طریق دست‌ورزی ژنتیکی، پیش شرطی کردن سلول‌ها این مزیت را دارد که خطر تومورزایی را نداشته و تغییرات پایدار در سلول‌ها ایجاد نمی‌کند. از طرفی نیز در این فرآیند، سلول‌ها با عواملی مواجه می‌شوند که به طور طبیعی با آن‌ها رو به رو می‌شوند، بنابراین سلول‌ها در معرض شرایط ناشناخته جدید که می‌تواند برای آن‌ها مضر باشد قرار نمی‌گیرند. از دیگر مزایای پیش شرطی کردن این است که مقاومت بالایی را در سلول‌ها ایجاد می‌کنند. به طوری که در مطالعه‌ای که انجام شد، مشاهده گردید که غلظت  $5\text{ }\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  موجب می‌شود تا حدود ۸۵٪ از سلول‌ها در برابر شرایط کشنده القا شده، زنده بمانند.

### نتیجه‌گیری

پیش شرطی کردن فرآیندی است که طی آن سلول‌ها به طور موقتی تحريك شده و به طور موقتی هم فعال می‌شوند بنابراین می‌توان از آن به عنوان راهکاری مؤثر در جهت افزایش بقای سلول‌ها پس از پیوند و افزایش اثر بخشی پیوند، بدون داشتن خطرات سرطان‌زاوی، بهره گرفت.

عرض عوامل کشنده (غاظت‌های کشنده  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) قرار دادیم و در ادامه میزان بقای سلولی را به طور کیفی با تریپان‌بلو و به طور کمی با آزمایش MTT assay اندازه‌گیری نمودیم. در طی آزمایش‌های متعددی که انجام دادیم، نتایج حاکی از این بود که پیش شرطی کردن سلول‌ها با  $\text{H}_2\text{O}_2$  می‌تواند موجب افزایش مقاومت MSCs در پاسخ به استرس‌های کشنده شده و بقای سلولی را به میزان قابل توجهی در مقایسه با کنترل (MSCs معمولی) که تحت هیچ گونه فرآیند پیش شرطی کردن نگرفته بهبود دهد.

نتایج آزمایش‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پیش شرطی کردن MSCs با عوامل اکسیدان، می‌تواند یک سیستم دفاعی قوی برای MSCs در جهت مقابله با آسیب‌های وارد در شرایط *in vitro* و *in vivo* فراهم کند. در تایید مطالب ذکر شده، تانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در طی تحقیقاتی که انجام دادند ثابت کردند که پیش شرطی کردن به وسیله  $\text{H}_2\text{O}_2$  در رده سلولی PC12، اثرات محافظتی در برابر استرس‌های اکسیداتیو دارد و باعث کاهش آپوپتوز از طریق مکانیسم‌های ROS، MMP و Bcl-2 می‌شود. هم چنین شی یانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که پیش شرطی کردن  $\text{H}_2\text{O}_2$  با MSCs باعث افزایش بیان مولکول چسبندگی CXCR4 و جلوگیری از آپوپتوز MSCs می‌شود(۳۱).

اشمل کو و همکارانش در سال ۲۰۰۵ نشان دادند کشت سلول‌های CD133<sup>+</sup> در حضور VEGF و فاکتور رشد سلول‌های عصبی مشتق شده از مغز (b NGF) به صورت تکی یا هر دو با هم، تمایز میواندوتیال سلول‌های CD133<sup>+</sup> را تقویت می‌کنند.

آپوپتوز یکی از عوامل بسیار مهم کاهش بقای MSCs در پیوند می‌باشد. مطالعه‌ها نشان می‌دهند که پیش شرطی کردن سلول‌ها، سبب فعال شدن مسیرهای آنتی‌آپوپتویک شده و در نتیجه بقای MSCs را افزایش می‌دهد. در تایید این موضوع می‌توان به مطالعه پاریزاس و همکارانش اشاره کرد که در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که واکنش IGF-1/IGF-1R باعث فعال شدن متوالی مسیرهای انتقال سیگنالی می‌شود که از آپوپتوز سلول جلوگیری می‌کنند. در این مطالعه، سلول‌ها را به صورت موقتی در معرض

و پژوهشی طب انتقال خون می باشد.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد  
همatology مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی

### References:

- 1- Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res* 1980; (151): 294-307.
- 2- 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.
- 3- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74(5): 1124-36.
- 4- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279(5356): 1528-30.
- 5- Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs* 2001; 25(3): 187-93.
- 6- Hakuno D, Fukuda K, Makino S, Konishi F, Tomita Y, Manabe T, et al. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 2002; 105(3): 380-6.
- 7- Haider HKh, Ashraf M. Strategies to promote donor cell survival: combining preconditioning approach with stem cell transplantation. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(4): 554-66.
- 8- Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC, Robbins PD, Pruchnic R, Huard J. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J Cell Biol* 1998; 142(5): 1257-67.
- 9- Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(5): 879-88.
- 10- Hodgetts SI, Beilharz MW, Scalzo AA, Grounds MD. Why do cultured transplanted myoblasts die in vivo? DNA quantification shows enhanced survival of donor male myoblasts in host mice depleted of CD4+ and CD8+ cells or Nk1.1+ cells. *Cell Transplant* 2000; 9(4): 489-502.
- 11- Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(2): 416-25.
- 12- Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(5): 907-21.
- 13- Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(4): 567-81.
- 14- Pasha Z, Wang Y, Sheikh R, Zhang D, Zhao T, Ashraf M. Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovasc Res* 2008; 77(1): 134-42.
- 15- Afzal MR, Haider HK, Idris NM, Jiang Sh, Ahmed R, Ashraf M. Preconditioning promotes survival and proliferation of mesenchymal stem cells in the infarcted rat heart via activation of NF-B downstream of PI3K/Akt signaling. *Circulation* 2007; 116: II\_68.
- 16- Cui JH, Park SR, Park K, Choi BH, Min BH. Preconditioning of mesenchymal stem cells with low-intensity ultrasound for cartilage formation in vivo. *Tissue Eng* 2007; 13(2): 351-60.
- 17- Suzuki K, Smolenski RT, Jayakumar J, Murtuza B, Brand NJ, Yacoub MH. Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation* 2000; 102(19 Suppl 3): III216-21.
- 18- Gürke L, Marx A, Sutter PM, Frentzel A, Salm T, Harder F, et al. Ischemic preconditioning improves post-ischemic skeletal muscle function. *Am Surg* 1996; 62(5): 391-4.
- 19- Maulik N, Yoshida T, Engelman RM, Deaton D, Flack JE 3rd, Rousou JA, et al. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death associated with ischemia/reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1998; 186(1-2): 139-45.
- 20- Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83(4): 1113-51.
- 21- Das S, Engelman RM, Maulik N, Das DK. Angiotensin preconditioning of the heart: evidence for redox signaling. *Cell Biochem Biophys* 2006; 44(1): 103-10.
- 22- Suzuki YJ, Nagase H, Day RM, Das DK. GATA-4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37(6): 1195-203.
- 23- Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(8): 2173-82.
- 24- Kim HW, Haider HK, Jiang S, Ashraf M. Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2. *J Biol Chem* 2009; 284(48): 33161-8.
- 25- Li S, Deng Y, Feng J, Ye W. Oxidative preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells migration and prevents apoptosis. *Cell Biol Int* 2009; 33(3): 411-8.
- 26- Fernández V, Tapia G, Varela P, Gaete L, Vera G, Mora C, et al. Causal role of oxidative stress in liver preconditioning by thyroid hormone in rats. *Free Radic Biol Med* 2008; 44(9): 1724-31.
- 27- Tang XQ, Feng JQ, Chen J, Chen PX, Zhi JL, Cui Y, et al

- al. Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PC12 cells: mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2. *Brain Res* 2005; 1057(1-2): 57-64.
- 28- van Velthoven CT, Kavelaars A, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatr Res* 2012; 71(4 Pt 2): 474-81.
- 29- Shmelkov SV, Meeus S, Moussazadeh N, Kermani P, Rashbaum WK, Rabbany SY, et al. Cytokine preconditioning promotes codifferentiation of human fetal liver CD133+ stem cells into angiomyogenic tissue. *Circulation* 2005; 111(9): 1175-83.
- 30- Xu M, Wang Y, Ayub A, Ashraf M. Mitochondrial K(ATP) channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(3): H1295-303.
- 31- Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 2006; 70(2): 240-53.
- 32- Nasef A, Fouillar L, El-Taguri A, Lopez M. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Libyan J Med* 2007; 2(4): 190-201.

*Original Article*

## **Enhancement of the resistance of mesenchymal stem cells against killing conditions by the oxidative preconditioning**

**Bashiri Nahanji H.<sup>1</sup>, Habibi Roudkenar M.<sup>1</sup>, Halabian R.<sup>2</sup>, Jalili M.<sup>3</sup>, Jalili M.A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

### **Abstract**

#### **Background and Objectives**

About 70% of MSCs die in the early stages of transplantation into the infarcted myocardium. Several solutions have been made to address this problem. In the last decade, preconditioning of MSCs with oxidative stresses has gained a lot of attention. In this study, we have investigated the effects of preconditioning with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) on the survival of MSCs and their resistance against oxidative stresses.

#### **Materials and Methods**

Mesenchymal stem cells from bone marrow have been cultured. Cells from the passage four were treated with 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, and 100 $\mu$ M concentrations of  $H_2O_2$ , and were then recovered with the fresh medium. Finally, the treated cells were exposed to 500  $\mu$ M  $H_2O_2$  as the killing condition. The percentage of survived cells was analyzed by the MTT assay kit.

#### **Results**

Preconditioning with 5 and 10  $\mu$ M  $H_2O_2$  significantly increased the resistance of MSCs against the apoptosis induced by 500  $\mu$ M  $H_2O_2$ .

#### **Conclusions**

Preconditioning of MSCs with oxidative stresses enhances their survival; therefore, it can increase the efficacy of transplantation.

**Key words:** Hydrogen Peroxide ( $H_2O_2$ ), Ischemic Preconditioning, Apoptosis, Multipotent Mesenchymal Stromal Cells

*Received: 9 Sep 2012*

*Accepted: 11 Feb 2013*

---

*Correspondence:* Jalili MA., 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*