# مطالعه تاثیر فاکتورهای رشد TGF-β2 و BMP-2 بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کاردیومیوسیت

**الهام صفرپور (M.Sc.)[1]، کاظم پریور (Ph.D.)[2]، محمد مهدی آخوندی (Ph.D.)[3]، محمود جدی تهرانی (Ph.D.)[4]، فاضل شکری (Ph.D.)[4,5]، امیر حسن زرنانی (Ph.D.)[6,7]، محمد کرامتی پور (Ph.D.)[8]، شیدا صالح‌خو (B.Sc.)[3]، لیلا عینی (B.Sc.)[3]، محمد رضا صادقی (Ph.D.)[4]**

۱ـ دانشجوی دکترای تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲ـ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۳ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ـ ابن‌سینا، تهران، ایران.

٤ـ مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ـ ابن‌سینا، تهران، ایران.

٥ـ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران، تهران، ایران.

٦ـ مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی زیستی، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ـ ابن‌سینا، تهران، ایران.

۷ـ گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.

۸ـ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران، تهران، ایران.

# چکیده

**زمینه و هدف:** تحقیقات در زمینه سلول‌های بنیادی و کاربردهای بالقوهٔ آنها نویدی برای درمان بسیاری از بیماری‌های صعب‌العلاج از جمله آسیب‌های قلب فراهم نموده است. در این رابطه تمایز هدایت شده و تحت کنترل سلول‌های بنیادی به سلول‌های میوکاردی در خارج از بدن و حتی در موضع بافت آسیب‌دیده حائز اهمیت است. با توجه به نقش دو فاکتور TGF-β2 و BMP-2 از خانواده بزرگ فاکتورهای رشد TGF-β در رشد، تمایز، مهاجرت و سایر اعمال سلولی طی تکامل جنینی، در مطالعه حاضر اثرات این دو فاکتور بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کاردیومیوسیت مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** سلول‌های بنیادی جنینی موش نژاد 129 از رده CCB برای تولید کاردیومیوسیتها مورد مطالعه قرار گرفتند. در این روش به منظور تأثیر هرچه بیشتر فاکتورهای فوق، کلونی سلول‌های بنیادی در گروه‌های تجربی بر روی فیبروبلاست غیرفعال کشت داده شد و به مدت ٢٤ ساعت با محیط کشت تمایزی حاوی ۸ *ng/ml* فاکتور TGF-β2 و ٥ *ng/ml* فاکتور BMP-2 همراه با کاهش سرم از ۲۰٪ به ۷/٥٪ تغذیه شدند. سپس از این سلولها اجسام جنینی ۸۰۰ سلولی در قطرات معلق و سوسپانسیون تهیه گردید و سپس اجسام جنینی در پلیت‌های ژلاتینه کشت داده شدند. با تداوم کشت سلول‌های بنیادی به سلول‌های ضربان‌دار تمایز یافتند. به منظور تائید تأثیر فاکتورها بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کاردیومیوسیت، بیان فاکتورهای رونویسی اولیه MEF-2 و NKx2.5 و ژن‌های تخصصی سلول‌های قلبی MHC، ANF و MLC-2v با روش RT-PCR نیمه کمی و بیان پروتئین دسمین و آلفا اکتینین در کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته به روش Western-blot و حضور کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته بوسیله رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی با آنتی‌بادی اولیه ضد دسمین بررسی شد.

**نتایج:** پس از طی مراحل تمایزی، از اطراف اجسام جنینی پلیت شده سلول‌های تمایز یافته دوکی شکل ضربان‌دار در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل به وضوح قابل مشاهده بود. با توجه به مقایسه کمی باندهای حاصله از RT- PCR اجسام جنینی پلیت شده در محیط‌های با فاکتورهای مختلف مشاهده گردید که فاکتور TGF-β2 از فاکتور BMP-2 و هر دو فاکتور به صورت همزمان از هر یک به تنهایی، اثر افزایشی بیشتری بر تمایز کاردیومیوسیتها از سلول‌های بنیادی جنینی دارد. این امر با اندازه‌گیری کمی باندهای RT-PCR حاصله از بیان ژن‌های تخصصی قلبی در سلول‌های کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته نشان داده شد. همچنین در اجسام جنینی پلیت شده در محیط با هر دو فاکتور پس از تمایز، بیان دو پروتئین دسمین و آلفا اکتینین توسط Western-blot و نیز حضور سلول‌های کاردیومیوسیت توسط نشانگذاری پروتئین دسمین با روش ایمنوهیستوشیمی تأیید شد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که تأثیر همزمان دو فاکتور BMP-2, TGFB2 همراه با کاهش سرم در طی زمان کشت و جسم جنینی، هدایت سلول‌های بیماری جنینی را در جهت تمایز به کاردیوسیتها افزایش می‌دهد.

**کلید واژگان:** سلول‌های بنیادی جنینی، تمایز، کاردیومیوسیت، TGF-β2، BMP-2.

**مسئول مکاتبه:** دکتر محمدرضا صادقی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ـ ابن‌سینا، اوین، صندوق پستی: ۱۷۷-۱۹۸۳٥، تهران، ایران.

**پست الکترونیک:** sadeghi@avesina.ac.ir



Archive of SID

www.SID.ir

## زمینه و هدف

سلول‌های بنیادی جنینی از رشد و تکثیر و عدم تمایز توده سلولی داخلی جنین[1] در مرحله بلاستوسیست بدست می‌آیند. این سلولها همه توان[2] بوده و توانایی تولید هر سه رده اکتودرمی، مزودرمی و اندودرمی جنینی را دارند (۱). این سلولها می‌توانند دو سرنوشت مجزا و متفاوت، همه توانی یا تمایز را انتخاب کنند که این انتخاب بستگی به تحریکات داخل سلولی و یا موجود در محیط کشت این سلولها دارد. به عبارتی سلول‌های بنیادی جنینی در محیط کشت اختصاصی خود در شرایط in-vitro قدرت تقسیم مجدد[3] خود را برای دوره‌های طولانی حفظ می‌کنند و به طور مکرر تکثیر می‌یابند. در عین حال این سلولها تحت شرایط فیزیولوژیکی خاص به انواع سلول‌های با عملکردهای تخصصی نظیر سلول‌های عضله قلبی، سلول‌های مولد انسولین، سلول‌های عصبی، فیبروبلاست، عضله اسکلتی، صاف و یا انواع سلول‌های دیگر تمایز می‌یابند (۴-۲).

برای حفظ همه توانی و تکثیر مجدد، بدون انجام تمایز سلول‌های بنیادی جنینی بر روی فیبروبلاست غیرفعال شده جنین موش یا با افزودن فاکتورهای مهارکننده تمایز از جمله فاکتور مهارکننده لوکوسیتها LIF[4] به محیط آنها تکثیر می‌یابد (۵-۲). LIF موجود در محیط به عنوان یک سیتوکین از طریق رسپتور سطح سلولی خود موجب سنتز فاکتور رونویسی[5] oct-4 و حفظ همه توانی و تکثیر مجدد سلولها می‌شود. با حذف این سیتوکین از محیط و یا حذف فیبروبلاست‌های جنینی، تشکیل اجسام جنینی از سلول‌های بنیادی شروع می‌شود (۶). به طور معمول بین ۱ تا ۴ روز بعد از کشت هر جسم جنینی، سلول‌های بنیادی به انواع مشتقات سلولی مشابه با آنچه که در سه لایه جنینی اولیه یافت می‌شود، تمایز می‌یابند. نوع تمایز این سلولها بستگی به انواع فاکتورهای محیطی دارد که سلول با آنها مواجه می‌باشد. بسته به شرایط محیط برخی از این سلولها به کاردیومیوسیتها تمایز می‌یابند که در نهایت در جنین[6] عضله قلبی را ایجاد می‌کنند (۷).

از جمله مشکلاتی که امروزه جامعه انسانی با آن مواجه است بیماری‌های قلبی- عروقی است. در مشکلات ایسکمیک عضله قلب سلولها دچار آسیب شده و در عملکرد طبیعی کاردیومیوسیت‌های اختلال ایجاد شده و از آنجایی که کاردیومیوسیت‌های بالغ قادر به بازسازی و ترمیم خود نیستند، میزان مرگ و میر این بیماریها فوق‌العاده زیاد است؛ لذا یافتن مخزن سلولی در دسترس که بتواند در صورت نیاز به کاردیومیوسیت متمایز شود و به محل آسیب تزریق شود تحولی شگرف را در درمان این بیماران فراهم خواهد نمود. از اینرو تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کاردیومیوسیتها یکی از تحقیقات مهم و به روز بوده و از اهمیت خاصی برخوردار است (۷). در اکثر مطالعات انجام شده اجسام جنینی حاصل از سلول‌های بنیادی در حضور سرم محیط و شرایط قطره‌گذاری تمایز می‌یابند که این به نوعی تمایز خود به خودی و غیرمستقیم محسوب می‌شود و انواعی از سلول‌های تمایز یافته در آن ظاهر می‌شود که در میان آنها کاردیومیوسیت‌های ضربان‌دار هم دیده می‌شود (۹-۷). با توجه به عدم خلوص این سلولها و تمایز همزمان به سایر رده‌های سلولی این کاردیومیوسیتها به منظور پیوند و سلول تراپی مناسب نیستند، بدین منظور نیاز به سلول‌های تمایز یافته خالص است که عاری از سایر رده‌های سلولی باشد (۱۰-۸). بنابراین انتخاب شرایط محیطی و فاکتورها و عواملی که بتوانند موجب تمایز جهت‌دار و مستقیم شود

1- Inner Cell Mass (ICM)
2- Pluripotent
3- Self-renewal
4- Leukemia Inhibitory Factor (LIF)
5- Octamer binding protein
6- ESCD



Archive of SID
www.SID.ir

همواره مدنظر محققان در این حیطه بوده و تحقیقات گسترده‌ای در این زمینه در حال انجام است.

در این راستا نقش فاکتورهای رشد در محیط in vivo در طی مراحل تمایزی سلول‌های مزودرمی به سلول‌های کاردیومیوسیت در دوران جنینی کاملاً شناخته و ثابت شده است. از اینرو بکارگیری این فاکتورها می‌توانند در تهیه رده سلولی کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته با درجه خلوص بالا و نیز کاردیومیوسیت‌های اختصاصی‌تر مانند سلول‌های دهلیزی، بطنی و نیز گره‌ای مورد استفاده قرار گیرد. از جمله این فاکتورهای اولیه می‌توان به TGF-β2[1] و BMP-2[2] دو فاکتور از خانواده بزرگ فاکتورهای رشد TGF-β اشاره کرد که در القای مزودرم کاردیاک و تمایز کاردیومیوسیتها از آنها و نیز تنظیم رشد، تمایز و مهاجرت در طی رشد و نمو جنین اهمیت دارند. در شرایط in-vitro تخریب مسیرهای سیگنال TGF-β/BMP بوسیله آنتاگونیست‌هایی مانند noggin تمایز کاردیاک را از سلول‌های بنیادی جنینی مهار می‌کند (۱۱). موش‌های فاقد TGF-β2 عملکردی از ناهنجاری‌های قلبی- عروقی رنج می برند (۱۲). بدین ترتیب نقش فاکتورهای رشد خانواده TGF-β در رشد و تمایز سلول‌های کاردیومیت کاملاً به اثبات رسیده است. لذا هدف این مطالعه بررسی اثر افزودن فاکتورهای رشد TGF-β2 و BMP-2 در القای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کاردیومیوسیتها در محیط in vitro می‌باشد.

## روش بررسی

***الف) کشت فیبروبلاست‌های غیرفعال:*** فیبروبلاست جنینی از جنینی‌های ۱۳-۱۲ روزه موش‌های BALB/C تهیه شدند. بدین منظور جنین ۱۲ الی۱۳ روزه از رحم موش ماده خارج و پس از ضد عفونی با الکل سر، دم و بافت‌های کبد و قلب آن جدا گردید، سپس باقیمانده بدن جنین قطعه قطعه شده و همراه با آنزیم تریپسین در دمای ٤ ℃ در یخچال به مدت ٢٤ ساعت نگهداری شود. بعد از زمان ذکر شده مخلوط جنینها و آنزیم از سرنگ عبور داده شود و پس از طی ٦٠-٣٠ دقیقه و رسوب قطعات بافتی، مایع رویی آن جمع‌آوری گردید و در مقادیر کم به پلیت‌های کشت سلولی ژلاتینه شده حاوی محیط کشت فیبروبلاست، (MEF medium) شامل DMEM همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FCS)، ۱*ml* L– گلوتامین ۲۰۰*mM*، ۱*ml* اسید آمینه غیر ضروری (۲۰۰*mM*)، ۲۰۰*µl* بتا مرکاپتو اتانول (2ME) ۵۰*mM* (تمامی مواد محصول شرکت Gibco آلمان بود) ۱*ml* پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (100x) اضافه گردید و در انکوباتور $CO_2$ به میزان ۵٪ و دمای ۳۷ ℃ قرار گرفت. بعد از ٢٤ ساعت فیبروبلاست‌های دوکی شکل به کف پلیت چسبیده‌اند. به منظور غیرفعال کردن فیبروبلاستها محیط کشت پلیت حاوی فیبروبلاست با تراکم بالای سلولی با محیط DMEM حاوی میتومایسین C به میزان ۱۰*µg/ml* (Sigma,USA) تعویض شده و پلیت به مدت ۳ ساعت در انکوباتور $CO_2$ به میزان ۵٪ و دمای ۳۷ ℃ قرار گرفت. بعد از طی این مدت محیط حاوی میتومایسین را خارج و دور ریخته و پلیت ۳ مرتبه با PBS شسته شد، سپس اتصال سلولها با کف پلیت کشت بوسیله واکنش آنزیمی تریپسین جدا گردید. بعد از سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰*g* به مدت ۵دقیقه، رسوب سلولی به پلیت ژلاتینه شده، حاوی محیط MEF اضافه شده و در انکوباتور نگهداری گردید تا برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی بکار رود (شکل۱-۱).

***ب) کشت سلول‌های بنیادی جنینی:*** سلول‌های بنیادی جنینی CCB (129/sv xy CCB ES cell line) حاصل از رشد توده سلولی داخلی بلاستوسیست جنین موش‌های نژاد 129، بر روی یک لایه فیبروبلاست جنینی موشی

1- Transforming Growth Factor β
2- Bone morphogenic protein



Archive of SID
www.SID.ir

غیرفعال شده به عنوان سلول‌های پشتیبان، کشت شدند. محیط کشت این سلولها شامل KnockOut DMEM حاوی FCS به میزان ۱۵٪، L-گلوتامین ۱ml، ۲۰۰mM، ۱ml اسیدهای آمینه غیر ضروری ۲۰۰Mm، ۲۰۰µl بتا مرکاپتو اتانول (2ME) (50mM) و ۱۰µl فاکتور LIF (Chemicon LIF, 1000U/ml) بود (تمام مواد مورد استفاده از شرکت Gibco آلمان تهیه شد). ضمن تعویض روزانه محیط کشت سلولی و بررسی رشد کلونیها توسط میکروسکوپ معکوس، کلونیها هر ۳-۲ روز یکبار با تریپسین جدا شده و پاساژ داده شدند تا کلونیها همچنان کوچک و تمایز نیافته بمانند (شکل۱-۱).

***ج) تشکیل اجسام جنینی وتمایز کاردیومیوسیتها:*** به منظور بررسی اثر فاکتورهای TGF-β2 و BMP-2 سه گروه تجربی و یک گروه کنترل درنظر گرفته شد. در گروه تجربی کلونی‌های سلول‌های بنیادی با محیط تمایزی حاوی FCS و فاکتورهای فوق به مدت ۲٤ ساعت و در گروه کنترل نیز کلونی‌های سلول‌های بنیادی در محیط مشابه فاقد فاکتور حاوی سرم کشت داده شدند. محیط تمایزی شامل GMEM (Gibco, Germany) حاوی FCS به میزان ۷/۵٪، ۱ml اسید آمینه‌های غیر ضروری ۲۰۰ mM (Gibco, Germany)، ۲۰۰ µl بتا- مرکاپتو اتانول (Gibco, Germany, 50mM, 2ME)، ۱۱۰mg/ml سدیم- پیرووات و ۸ ng/ml TGF-β2 (Sigma,USA) در یک گروه تجربی و یا ۵g/ml BMP-2 (Sigma,USA) در گروه دیگر تجربی و یا هر دو فاکتور در گروه آخر بود. پس از آن ۸۰۰ سلول بنیادی جنینی از هر سه گروه به صورت مجزا در قطرات ۲۰ میکرولیتری از همان محیط به صورت معلق در درب پلیت کشت باکتری به مدت ۲ روز کشت شدند تا اجسام جنینی[1] تشکیل شود (شکل۲-۱). سپس اجسام جنینی به صورت سوسپانسیون در پلیت دیگری به مدت ۵ روز نگهداری شدند. در تمام این مدت سلولها با محیط حاوی فاکتورهای فوق تغذیه شدند. اجسام جنینی ۷ روزه به صورت ده تایی در ظروف ۱۲ حفره‌ای کشت شدند. به منظور بررسی و تأیید تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های مزانشیمی کاردیومیوسیت از روش‌های مختلفی شامل بررسی مولکولی بیان ژن‌های تخصصی کاردیومیوسیتها به روش RT-PCR و نیز بررسی پروتئین‌های دسمین و آلفا- آکتینین با ایمنوهیستوشیمی و Western-blot استفاده شد.

***د) بیان ژن‌های تخصصی قلبی با RT-PCR:*** به منظور ارزیابی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های کاردیومیوسیت از روش RT-RCR استفاده شد. جهت استخراج RNA از سلول‌های تمایز یافته حاصل از کشت اجسام جنینی پس از ۱۲ و ۱٦ روز از شروع کشت و انجام عمل تمایز، عمل استخراج RNA با روش Guanidium Thiocyanate- Phenol- Chlorophorm انجام گرفت. در این روش ابتدا به رسوب سلولی حاصله از سلول‌های تمایز یافته حدود ۵۰۰µl از RNA-Bee افزوده تا عمل لیز سلولها انجام شود، سپس یک سوم حجم آن کلروفرم اضافه کرده و بعد از چند دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰min سانتریفیوژ گردید، پس از این مرحله دو فاز شفاف و فنلی جدا گردید، سپس فاز رویی را جدا کرده و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد افزوده و ۲ ساعت در ۲۰- ℃ نگهداری گردید. سپس با دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۱۲min سانتریفیوژ گردید، رسوب RNA در این مرحله قابل رویت است (در تمامی مراحل نمونه بر روی یخ نگهداری شود) با استفاده از پرایمر الیگو dT و آنزیم RT (Fermentas) cDNA از RNA استخراجی ساخته شد. سپس برای تکثیر cDNA مربوط به ژن‌های اختصاصی سلول‌های کاردیومیوسیت با استفاده از زوج‌های پرایمرهای مربوط به هر ژن، عمل PCR انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده شامل:

1- Embryoid body



Archive of SID
www.SID.ir

۱ـ mGAPDH[1] (۳۰۹bp و دمای ۶۰ ℃ و ۳۰ سیکل)
F-5′-CAGGGGCGAGACCCCACTA-3′
R-5′- GGCATGGACTGTGGTCATGA-3′

۲ـ Oct-4[2] (۳۱۲bp و دمای ۶۲ ℃ و ۳۵ سیکل)
F-5′-GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTG TTC-3′
R-5′-CTCGAACCACATCCTTCTCT-3′

۳ـ Brachyury[3] (۱۱۱bp و دمای ۶۰ ℃ و ۳۵ سیکل)
F-5′-GACTTCGTGACGGCTGACAA-3′
R-5′-CGAGTCTGGGTGGATGTAG-3′

۴ـ NKX2.5[4] (۱۵۰bp و دمای ۶۴ ℃ و ۳۵ سیکل)
F-5′-CATTTTACCCGGGAGCCTACGGTG-3′
R-5′-GCTTCCGTCGCCGCCGTG-3′

۵ـ MEF-2[5] (۱۹۶bp و دمای ۶۴ ℃ و ۳۵ سیکل)
F-5′-AGATACCCACAACACACCACGCGCC3′
R-5′-ATCCTTCAGAGAGTCGCATGCGCTT-3′

۶ـ α-MHC[6] (۳۰۱bp و دمای ۶۴ ℃ و ۳۵ سیکل)
F-5′-CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG-3′
R-5′-GGAAGAGTGAGCGGCGCATCA AGG-3′

۷ـ β-MHC[7] (۲۰۵ bp و دمای ۶۴ ℃ و ۳۵ سیکل)
F-5′-TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAG GGC-3′
R-5′-GCCAACACCAACCTGTCC AAG TTC-3′

۸ـ ANF[8] (۲۰۳ bp و دمای ۶۸ ℃ و ۳۵ سیکل)
F- 5′-TGATAGATGAAGGCAGGAAGCCGC-3′
R-5′-GGATTGGAGCCCAGAGTGGACTAGG-3′

۹ـ MLC-2v[9] (۱۸۹ bp و دمای ۶۸ ℃ و ۳۵ سیکل)
F-5′-TGTGGGTCACCTGAGGCTGTGGTTCAG-3′
R-5′-GAAGGCTGACTATGTCCGGGAGATGC-3′

محصولات PCR فوق بر روی ژل آگاروز ۲٪ به روش الکتروفورز جدا و با اتیدیوم بروماید رنگ شده و محل باندهای قابل مشاهده در مقایسه با کنترل‌های مثبت و منفی با دستگاه U.V Transluminator تمامی باندهای حاصله با مارکر ۱۰۰ bp سنجیده شد.

***ه) بررسی حضور پروتئین دسمین وآلفا اکتینین به روش Western blot:*** اجسام جنینی که درون حفرات پلیت کشت شده بودند در روز ۱۶ تمایز بوسیله تریپسین جدا شده و پس از سانتریفوژ به آن ۵۰۰$\mu l$ از محلول بافر نمونه شامل Tris-HCl ۵۰۰$\mu l$ و Bromophenol Blue ۰/۴$mg$ ۰/۵$M$ (pH=۶/۸)، ۰/۸$ml$ SDS[10] (۱۰٪) و نیز ۰/۴$ml$ گلیسرول (۵۰٪) و ۰/۳$ml$ آب مقطر افزوده تا عمل لیز سلولی تسهیل گردد. سپس میکروتیوب حاوی نمونه به مدت ۱/۵ دقیقه در آب در حال جوش قرار گرفت و پس از سانتریفیوژ به هر چاهک الکتروفورز به میزان ۴۰$\mu l$ از سوسپانسیون سلولی اضافه گردید. از هر نمونه در دو چاهک به طور قرینه ریخته شده تا بتوان ژل حاصل را به دو قسمت مساوی تقسیم نمود. پس از انجام الکتروفورز نیمی از ژل رنگ‌آمیزی گردید و نیم دیگری از ژل در مجاورت کاغذ PVDF[11] قرار گرفته تا باندهای جدا شده روی ژل به روش Electroelution به کاغذ منتقل گردد. جهت تأیید انتقال، کاغذ PVDF را با Ponso-S رنگ‌آمیزی شد. سپس با BSA یا Skim-milk (بلاکینگ) جایگاه‌های فعال سطح کاغذ غیرفعال گردید در این مرحله می‌توان کاغذ را برای بررسی بعدی در ۲۰- ℃ نگهداری کرد، در ادامه کار کاغذ حاوی باندها با آنتی‌بادی اولیه ضد دسمین و آنتی‌بادی اولیه ضد آلفا- اکتینین به طور جداگانه انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو نمونه‌ها با TPBS، نوارها با آنتی‌بادی ثانویه Rabbit Anti Mouse IgG کونژوگه با HRP انکوبه شده و مجدداً ۳ بار دیگر با TPBS شسته و جهت مشخص شدن باند پروتئینی مورد نظر نوارهای کاغذی را به تانک حاوی سوبسترای نامحلول HRP انتقال داده شد. بعد از ۱۰ دقیقه انکوباسیون نوارها در سوبسترا، باند مربوط با ایجاد رنگ قهوه‌ای تیره و رسوب آن در ناحیه باند پروتئینی شناسایی و با انتقال نوارها به درون بافر PBS واکنش رنگ‌زایی متوقف گردید. با توجه به ناپایداری رنگ ایجاد شده، سریعاً از نمونه‌ها عکس تهیه گردید.

***و) بررسی حضور پروتئین دسمین با روش ایمنوهیستوشیمی:*** در مرحله تمایز، اجسام جنینی که به

1- Mouse Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
2- Octamer binding protein
3- Mesodermal gene
4- NK-homeo box 2.5
5- Myocyte Enhancer Factor
6- α-myosin heavy chain
7- β- myosin heavy chain
8- Atrial natriuretic factor
9- Myosin light chain ventricular
10- Sodium dodecylsulfate
11- Microporous Polyvinylidene difluoride

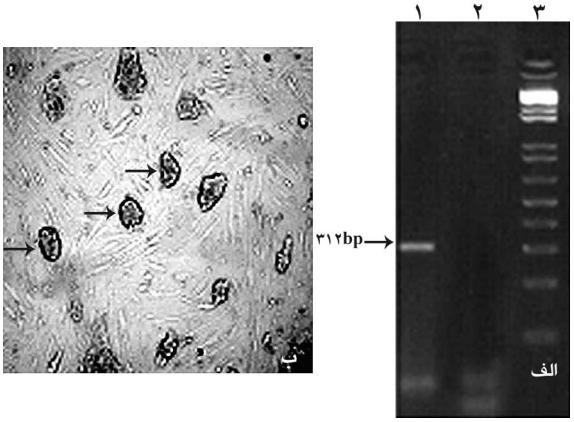


Archive of SID
www.SID.ir

روی Coverslip ژلاتینه در حفرات پلیت ۱۲ حفره‌ای منتقل شده بودند، چسبیده و ضمن تمایز به اطراف گسترده شده‌اند. ۷ روز بعد از کشت اجسام جنینی، Coverslip توسط پنس از حفره خارج و با PBS ۲ بار شسته شدند و سپس حدود ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند تا در مجاورت هوا خشک شوند. پس از آن توسط چسب بر روی لام شیشه‌ای چسبانده و به مدت ۵ دقیقه در استن سرد ۲۰ ℃- نگهداری شد تا تثبیت شوند. سپس سه مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر شستشو و پس از آن با سرم خرگوش ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه پوشانده شدند. لامها با آنتی‌بادی‌های اولیه ضد دسمین (Sigma,USA) با رقت ۱:۲۰ در دمای ۳۷ ℃ به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه شدند. پس از شستشوی مجدد مانند مرحله قبل، لامها با آنتی‌بادی ضدایمونوگلوبولین موشی کونژوگه با HRP (پژوهشکده ابن‌سینا) به نسبت ۱:۵۰ در دمای ۳۷ ℃ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس مرحله شستشو مطابق قبل تکرار و محلول DAB (Sigma,USA) آماده بر روی اسلایدها اضافه گردید. پس از ۱۵-۵ دقیقه اسلایدها سه بار با آب شسته شده و ۲-۱ دقیقه با هموتوکسیلین رنگ‌آمیزی زمینه شدند در انتها به‌مدت ۵ دقیقه در گزیلول قرار داده شد و پس از مانته کردن و با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند.

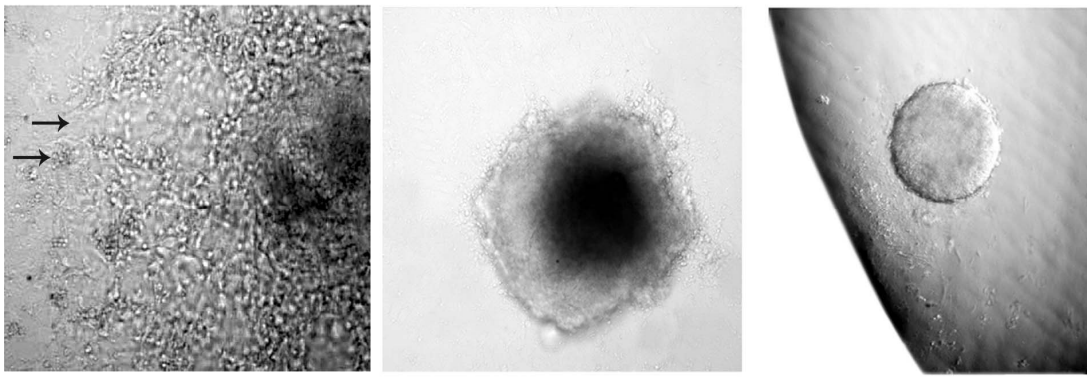
## نتایج

***الف) تمایز کاردیومیوسیتها از سلولهای بنیادی جنینی:***




شکل ۱- الف) مشاهده قطعه ژن Oct-4 از سلول‌های بنیادی جنینی موش ردهٔ CCB؛ ستون ۱: نمونهٔ سلول‌های جنینی CCB، ستون ۲: نمونهٔ کنترل منفی بدون CDNA، ستون ۳: مارکر ۱۰۰bp. ب) کلنی‌های سلول‌های بنیادی جنینی ردهٔ CCB برروی سلول‌های فیبروبلاست (پیکانها کلونی‌های سلول‌های بنیادی را نشان‌می‌دهند.)

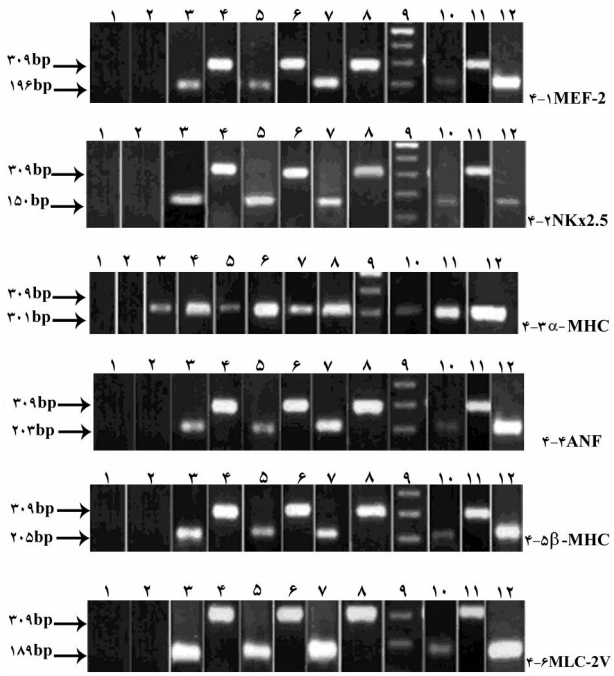
در مراحل این روش ابتدا سلول‌های بنیادی جنینی رده CCB انتخاب و به صورت کلونی بر روی فیبروبلاست کشت داده شدند (شکل۱ــ ب)، برای تأیید همه توان بودن عدم تمایز این سلولها بیان ژن oct-4 بررسی شد (شکل ۱ـ الف). بعد از اینکه کلونیها در معرض محیط کشت تمایزی حاوی فاکتورها و سرم ۷/۵ ٪ قرار گرفتند بیان ژن Brachyury توسط RT-PCR نیمه کمی در روز پنجم بررسی شد. افزایش بیان این ژن در سلول‌های تمایز یافته تحت تأثیر فاکتورها در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که افزودن فاکتورهای فوق موجب افزایش القا ژن‌های مزودرمی در سلول‌های بنیادی می‌گردد. سپس در ادامه کلونی‌های سلول‌های بنیادی به صورت تک سلولی درآمده و در قطرات معلق با تعداد ۸۰۰ سلول قرار گرفتند. تعداد اولیه سلول‌های




شکل ۲-الف) یک جسم جنینی کروی حاوی ۸۰۰ سلول در یک قطرهٔ ۲۰ میکرولیتری در روز اول تمایز، ب) همان جسم جنینی در روز هفتم تمایز، ج) همان جسم جنینی کاشته شده در پلیت در روز چهاردهم تمایز.

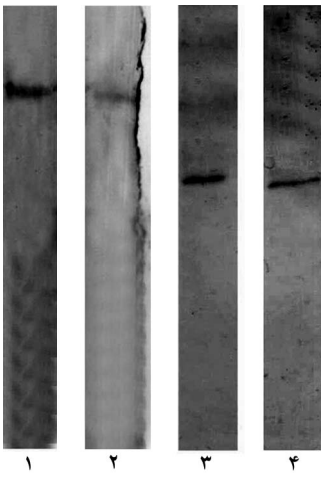


Archive of SID
www.SID.ir




شکل۳- مشاهده قطعات ژن‌های خاص قلبی در کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی؛ ستون‌های ۱: نمونه کنترل بدون cDNA، ۲: نمونه سلول‌های مغز موش بعنوان گروه کنترل منفی، ۳: نمونه سلول‌های تیمار با TGF-β2 ۸*ng/ml*، ٤: mGAPDH نمونه ستون ۳، ٥: نمونه سلول‌های تیمار با BMP-2 ٥*ng/ml*، ٦: mGAPDH نمونه ستون ٥، ۷: نمونه سلول‌های تیمار شده با TGF-β2 ۸*ng/ml* و BMP-2 ٥*ng/ml*، ۸: mGAPDH نمونه ستون ۷، ۹: مارکر مولکولی (۱۰۰*bps*)، ۱۰: نمونه سلول‌های تیمار نشده، ۱۱: mGAPDH نمونه ستون ۱۰، ۱۲: نمونه سلول‌های قلب موش به‌عنوان گروه کنترل مثبت. mGAPDH به عنوان یک house keeping gene در تمامی سلول‌های موشی بیان می‌شود. ۱-٤: MEF-2، ۲-٤: NKx2.5، ۳-٤: α-MHC، ٤-٤: ANF، ٥-٤: β-MHC، ٦-٤:MLC-2v.

بنیادی در تمایز نهایی بسیار مهم است (شکل ۲ـ الف). پس از تشکیل اجسام جنینی در قطرات معلق (۲ روز) و سوسپانسیون (٥ روز) به تدریج اجسام جنینی بدون چسبندگی به ظرف با اطراف نامنظم بزرگتر شده (شکل۲ـ ب) و در ادامه در روز هفتم به پلیت‌های کشت سلولی ژلاتینه شده، انتقال داده شدند. اجسام جنینی به کف پلیت چسبیده و به تدریج سلول‌های اطراف آنها ضمن تغییر شکل، مهاجرت کرده و از آن دور می‌شوند (شکل ۲ـ ج). در روزهای متفاوتی این سلولها بررسی شدند، کاردیومیوسیت‌های ضربان دار ۱ تا ۲ روز پس از کشت به صورت پراکنده در اطراف هر جسم جنینی در هر سه گروه تیمار شده با TGF-β2 ۸*ng/ml* و BMP-2 ٥*ng/ml* و هر دو فاکتور همزمان و نیز در گروه کنترل با نسبت‌های متفاوت ظاهر شدند. به منظور



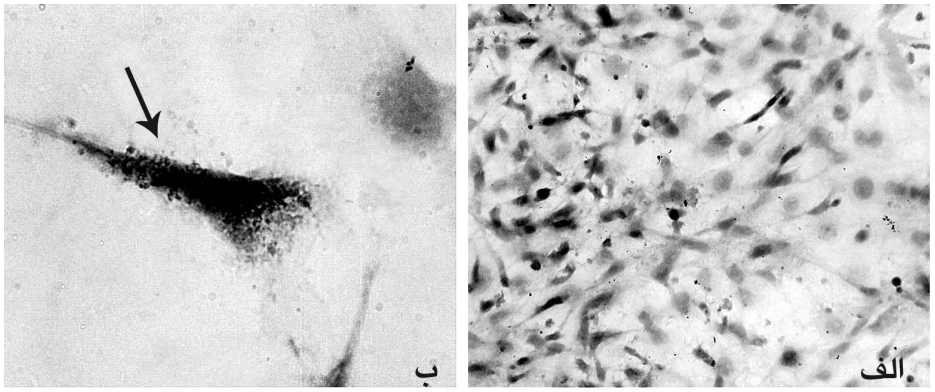

**شکل ۴**- آنالیز Western blot پروتئین Desmin و α-Actinin در سلول‌های کاردیومیوسیت تمایز یافته از سلول‌های بنیادی و سلول‌های قلب موش؛ ستون‌های ۱: مارکر، ۲: تأیید حضور پروتئین آلفا-آکتینین در بافت قلب موش با آنتی‌بادی ضد آلفاآکتینین و رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو، ۳: تأیید حضور پروتئین آلفا-آکتینین در سلول‌های کاردیومیوسیت تمایز یافته از سلول‌های بنیادی با آنتی‌بادی ضد آلفا-آکتینین، ٤: تأیید حضور پروتئین دسمین در بافت قلب موش با آنتی‌بادی ضد دسمین و رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو، ٥: تأیید حضور پروتئین دسمین در سلول‌های کاردیومیوسیت تمایز یافته از سلول‌های بنیادی با آنتی‌بادی ضد دسمین (وزن مولکولی پروتئین آلفا-آکتینین *kD* ۱۰۰ وزن مولکولی پروتئین دسمین *kD* ٥۰)

مقایسه بین این فاکتورها بیان ژن‌های تخصصی قلبی بررسی شد. همچنین اطلاعات ما نشان داد که فاکتورهای رشد ذکر شده موجب افزایش معنی‌داری در اندازه جسم جنینی یا افزایش قطر آنها در مقایسه با گروه کنترل نمی‌شود ($p<0/05$).

***ب) بیان ژن‌های تخصصی قلبی در کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی:*** افزایش بیان ژن‌های تخصصی قلبی ANF, α-MHC, β-MHC, NKx2.5, MEF-2 و mMLC-2v در کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته با روش RT-PCR نشان داد که ضمن افزایش بیان ژن مزودرمی Brachyury در اجسام جنینی تیمار شده با TGF-β2 و BMP-2، در گروه تیمار شده با هر دو فاکتور بیشترین بیان ژن‌های تخصصی قلبی وجود دارد. در مقایسه بین فاکتورها اثر تمایزی فاکتور TGF-β2 بر تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیتها بیشتر از اثر تمایزی فاکتور BMP-2 و



Archive of SID
www.SID.ir




**شکل ۵**- رنگ‌آمیزی کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی با آنتی‌بادی ضد دسمین؛ الف) اجتماعی از کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته که با آنتی‌بادی ضد دسمین رنگ شده است. نقاط قهوه‌ای نشانگر حضور پروتئین دسمین است که رنگ DAB رسوب کرده است. ب) پیکان یک سلول تمایز یافته کاردیومیوسیت را نشان می‌دهد که با آنتی‌بادی اولیه ضد دسمین و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه HRP و DAB رنگ‌میزی شده است. نقاط قهوه ای نشانگر حضور پروتئین دسمین است.

اثر هر دو فاکتور به صورت همزمان بیشتر از دو گروه قبلی موجب افزایش تمایز کاردیومیوسیتها از سلول‌های بنیادی جنینی شده است (شکل۳).

این افزایش توسط اندازه‌گیری مقایسه‌ای باندهای حاصله از بیان ژن‌های مشابه در کاردیومیوسیت تمایز یافته در محیط کشت‌های متفاوت به تأیید رسید.

***ج) بررسی پروتئین‌های تخصصی قلبی در کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی:*** بررسی حضور این پروتئینها در گروه تیمار شده با فاکتور و مقایسه آن با کاردیومیوسیت‌های قلب موش نوزاد (شکل ٤) تائیدی بر حضور کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی است.

در نمونه‌های تهیه شده از اجسام جنینی تمایزیافته که با روش ایمنوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی شدند، کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته به صورت دوکی، چند وجهی و حتی کروی دیده شدند. در نمونه‌های تمایزیافته روز دوازدهم پروتئین دسمین با آرایش ابتدایی دیده شدند (شکل ٥).

## بحث

امروزه انتخاب شرایط بهینه برای تمایز هدایت شدهٔ سلول‌های بنیادی جنینی یکی از مباحث اصلی تحقیقات در حیطهٔ سلول‌های بنیادی است و در این میان تولید کاردیومیوسیت‌های قلب از سلول‌های بنیادی جنینی کاربردهای بسیار گسترده مانند بررسی جزییات روند تمایزی و استفاده در جهت بازسازی میوکارد آسیب دیده دارد. پیوند سلول‌های بنیادی به قلب آسیب دیده نشان داده که سلول‌های بنیادی توانایی محدودی در بازسازی بافت دارند. بررسی تمایز کاردیومیوسیتها اولین بار توسط Doetschman در سال ۱۹۸۵ (۲) و سپس توسط Wobus در سال ۱۹۹۱ (۸) و Maltsev در سال ۱۹۹۳ (۱۳) انجام شده است (۲۱).

در اکثر تحقیقات، روند تمایز سلول‌های بنیادی به صورت خودبخود بررسی شده است. بدین منظور که دور کردن فاکتورهای مهارکننده تمایز و تشکیل جسم جنینی در محیط‌های سوسپانسیونی و افزایش سرم کشت سلول که حاوی پروتئینها و فاکتورهای رشد بسیاری می‌باشد موجب تمایز خودبخودی سلول‌های بنیادی به انواع سلولها مانند کاردیومیوسیتها شده است. پس از تمایز کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته جدا و از لحاظ روند ژنتیکی و مرفولوژیک از جمله حضور پروتئینها و فاکتورهای تأیید کننده مورد بررسی قرار گرفته‌اند. اما این سلولها برای پیوند کافی و مناسب نیستند (١٤).

از اینرو شناسایی فاکتورهای رشد مناسب به منظور افزایش تمایز کاردیومیوسیتها از سلول‌های بنیادی



Archive of SID
www.SID.ir

جنینی و تهیه کاردیومیوسیت‌های خالص به منظور انجام سلول تراپی لازم می‌باشد. بررسی روند تکوین و تحقیقات مختلف نشان داده که فاکتورهای رشد و تمایز یک نقش مهم در تعیین سرنوشت رده سلولی مشتق شده از سلول‌های بنیادی جنینی دارد. به طور مثال IL-3 در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به ماکروفاژ، ماستوسیت و نوتروفیل نقش دارد (۱۲).

نتایج ما نشان داد که تیمار سلول‌های بنیادی در مرحله کشت و اجسام جنینی، همزمان با دو فاکتور TGF-β2 و BMP-2 حتی در صورت کاهش سرم که خود یک عامل تمایز دهنده می‌باشد موجب ایجاد کاردیومیوسیتها و بیان بالایی از ژن‌های خاص قلبی می‌شود. همچنین کاردیومیوسیتها با مارکر پروتئینی تخصصی قلبی دسمین رنگ‌آمیزی شدند و نتایج Western blot هم تعیین کرد که فاکتورهای فوق موجب بیان پروتئین‌های تخصصی قلبی دسمین و آلفل- آکتینین شده است. در این مطالعه بر خلاف مطالعات قبلی (۱۲،۱۳، ۳) اولاً غلظت سرم محیط کشت کاهش یافت تا اثر تمایزی پروتئینها و فاکتورهای رشد آن حذف شود، از اینرو تمایز کاردیومیوسیت‌های حاصله به حضور فاکتورهای رشد اختصاصی بکار رفته مربوط می‌شود. در ثانی فاکتورهای TGF-β2 و BMP-2 در مرحله کشت سلول‌های بنیادی افزوده شده بود، تا ضمن بیان ژن مزودرمی Brachyury موجب افزایش سلول‌های مزودرمی و سپس قلبی شود. این مطالعه با مطالعات قبلی در تأثیر تمایزی این فاکتورهای رشد در تمایز کاردیومیوسیتها همخوانی دارد.

افزایش بیان ژن Brachyury در سلول‌های تیمار شده با فاکتورهای فوق با گزارش Schuldiner و همکارانش که اثر هشت فاکتور رشد را بر تمایز سلول‌های بنیادی بررسی کردند، مطابقت دارد. طبق نتایج ایشان اجسام جنینی در روز پنجم تمایز خود، رسپتورهای TGF-β، BMP، Activin-A (متعلق به گروه خانواده TGF-β) و فاکتورهای رشد دیگری را بیان می‌کنند (۱۵).

Kumar و همکارانش نشان دادند که TGF-β2 با دوز ۸*ng/ml* در مقایسه با TGF-β1 و TGF-β3 موجب افزایش تمایز کاردیومیوسیت‌های ضربان‌دار از سلول‌های بنیادی جنینی می‌شود و با روش Western blot افزایش بیان پروتئین α- اکتین را در اجسام جنینی تیمار شده با TGF-β2 نشان دادند (۱۲). در مطالعه حاضر نیز تأثیر TGF-β2 بر تمایز و بیان ژن‌های تخصصی قلبی و پروتئین α- اکتینین و دسمین به تأیید رسید.

Behfar و همکارانش در مطالعه خود نشان دادند که مسیر پاراکرینی TGF-β/BMP-2 برای تمایز مستقیم کاردیومیوسیت‌های ضربان‌دار از سلول‌های بنیادی جنینی به منظور سلول تراپی در قلب آسیب دیده مناسب است و بیان ژن‌های MEF-2 و NKx2.5 را با روش RT-PCR در سلول‌های تیمار شده نشان داد (۱۶). در مطالعه حاضر نیز بعد از تأثیر دو فاکتور بیان ژن‌های NKx2.5 و MEF-2 خصوصاً MEF-2 که از پیش‌سازهای بیان ژن‌های تخصصی قلبی می‌باشد، افزایش یافت.

محققین دیگر مانند Orkin (۱۷) و Simon (۱۸) و Zhu (۱۹) و همکارانشان در پی تحقیقات خود گزارش کردند که حضور BMP-2 در شرایط in-vitro موجب بیان نابجای فاکتور رونویسی قلبی NKx2.5 و خانواده GATA و نیز ژن خاص قلبی MHC می‌شود (۱۱).

طبق تحقیقات Boheler و همکارانش فاکتور BMPs برای کاردیوژنزیز ضروری است (۳).

نتایج ما نشان داد که سلول‌های بنیادی جنینی تحت تأثیر فاکتورهای رشد خانواده TGF-β به کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته تبدیل می‌شوند، به طوریکه این سلولها ابتدا انقباض را شروع کرده و ضمن بیان پروتئین‌های انقباضی و تخصصی دسمین و آلفا-



Archive of SID
www.SID.ir

اکتینین به تدریج کشیده‌تر شده و شکل خاص سلول‌های عضله قبلی را به خود می‌گیرند. این نتایج با سلول‌های قلبی استخراج شده از قلب موش نوزاد و سلول‌های بنیادی تیمار نشده نیز مقایسه شد. طبق گزارش ما افزودن این فاکتورها قبل از تشکیل اجسام جنینی و در مراحل اولیه موجب هدایت روند تمایزی به سلول‌های کاردیومیوسیت می‌گردد (۱۵).

## نتیجه‌گیری

تأثیر همزمان دو فاکتور TGF-β2 و BMP-2 ضمن فعال‌سازی مسیرهای مولکولی موازی هم موجب افزایش بیان ژن‌های تخصصی قلبی شده است. داده‌های حاصل نشان داد که می‌توان با استفاده از فاکتورهای تخصصی با دوز مناسب در محیط آزمایشگاه تکوین مزودرم به سلول‌های قلبی را تسریع نمود و ضمن تجزیه و تحلیل مراحل تکوینی آنها، کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته را شناسایی، جدا و تخلیص کرد. از این سلولها می‌توانند به عنوان منبع مناسبی برای پیوند و کاربردهای درمانی دیگر بهره برد.

## تشکر و قدر دانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله از زحمات کلیه همکاران پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا بویژه سرکار خانم قاسمی کارشناس بخش ژنتیک و جناب آقای بیات کمال تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## *References*

1- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981; 292:154-156.

2- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M. The in-vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol. 1985;87:27-45.

3- Boheler KR, Czyz J, Tweedie D. Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells Into Cardiomyocytes. Circ Res. 2002;91:189-201.

4- Ullao-Montoya F, Verfaillie C, Hu W. Culture systems for pluripotent stem cells. J Biosci Bioeng. 2005;100: 12-27.

5- Nichols J, Davidson D, Taga T. Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. Mech Dev. 1996;57:123-31.

6- Zandstra PW, Nagy A. Stem cell bioengineering. Annu Rev Biomed Eng. 2001;3:275-305. Review.

7-Kumar D, Kamp TJ, Lewinter M. Embryonic stem cells: differentiation into cardiomyocytes and potential for heart repair and regeneration, Coron. Artery Dis. 2005; 16:111-6.

8- Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and $Ca^{2+}$ channel blockers. Differentiation. 1991;48:173-182.

9- Wobus AM, Boheler KR, Embryonic Stem Cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol Rev. 2005;85:635-78.

10- Winkler J, Hescheler J, Sachinidis A. Embryonic stem cells for basic research and potential clinical applications in cardiology. Biochim Biophys Acta. 2005;1740 (2):240-8.

11- Sachinidis AK, Fleischmann B, Kolossov E. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. Cardio Rese. 2003;58:278-291.

12- Kumar D, Sun B. TGF-beta 2 enhances differentiation of cardiac myocytes from embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2005;332:135-41.

13- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. Mech Dev. 1993;44:41-50.

14- Czyz J, Wobus AM. Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors. Differentiation. 2001;8:167-74.

15- Schuldiner M, Yanuka O. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:11307-11312.



Archive of SID
www.SID.ir

16- Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. FASEB J. 2002;16:1558-66.

17- Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. Blood. 1992;80:575-581.

18- Simon MC. Gotta have GATA. Nat Genet. 1995;11:9-11.

19- Zhu J, Hill RJ, Heid PJ. End-1 encodes an apparent GATA factor that specifies the endoderm precursor in Caenorhabditis elegans embryos. Genes Dev. 1997;11: 2883-96.

Archive of SID



www.SID.ir