تحقیقی

# بیان هترولوگ هورمون کلسی‌تونین در باکتری *اشریشیاکلی*

زینب پورهاشم[۱]، مهدی عباسیان[۲]، دکتر مجید شهبازی[۳]، دکتر احد یامچی*[٤]

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی‌گلستان، گرگان، ایران. ۲- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران. ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ٤- استادیار، مهندسی ژنتیک و ژنتیک مولکولی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

## چکیده

**زمینه و هدف :** *کلسی تونین پلی‌پپتیدی کوچک با وزن مولکولی ۳/٤ کیلودالتون و ۳۲ آمینواسید است که از غدد پارافولیکولار تیروئید در پاسخ به افزایش غلظت سرمی کلسیم تولید می‌شود. این پپتید دارویی در درمان بیماری پاژت، پیشگیری و درمان کمکی پوکی استخوان و شوک هایپرکلسمی استفاده می‌شود. تولید نوترکیب این پپتید کوچک در سیستم پروکاریوتی به دلیل ناپایداری آن امکان‌پذیر نیست؛ لذا این مطالعه به منظور بیان هترولوگ هورمون کلسی‌تونین در باکتری اشریشیاکلی انجام شد.*

**روش بررسی :** *در این مطالعه تجربی برای بیان فراوان پپتید کلسی تونین ماهی سالمون، شریک الحاقی تیوردوکسین به انتهای آمین آن متصل شد و سازه ژنی کدکننده پروتئین الحاقی Trx-sCTبه میزبان بیانی E. coli BL21 (DE3) منتقل گردید.*

**یافته‌ها :** *آنالیز SDS-PAGE نشان‌دهنده بیان فراوان پروتئین نوترکیب پس از القا با IPTG بود.*

**نتیجه‌گیری :** *در این مطالعه سازه ژنی حاوی پپتید دارویی کلسی‌تونین سالمون در اتصال با شریک الحاقی تیوریدکسین همسانه‌سازی گردید. نتایج الکتروفورز نشان داد پروتئین الحاقی به صورت پایداری بیان شده است.*

**کلید واژه‌ها :** *کلسی‌تونین ، شریک الحاقی ، بیان فراوان ، سیستم بیانی پروکاریوتی*

* نویسنده مسؤول : دکتر احد یامچی ، پست الکترونیکی yamchi@gau.ac.ir

نشانی : گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، تلفن ۰۱۷-۳۲۵۵۲۵۲۰، نمابر ۳۲٤۳۷٦۱۸

وصول مقاله : ۱۳۹٤/۱۱/۱۹ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٤/۱۲/۲٤ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٤/۱۲/۲٤

## مقدمه

کلسی‌تونین (Calcitonin) یک هورمون پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی ۳/۴۳ کیلودالتون و ۳۲ اسیدآمینه است که توسط سلول‌های c از غدد پارافولیکولار تیروئید در حالت عادی در پاسخ به افزایش یون کلسیم سرم ترشح می‌گردد. ترشح کلسی تونین و پاراتورمون (Parathormone:PTH) در رابطه معکوس با یکدیگر هستند. به‌طوری که افزایش یون کلسیم پلاسما از ۹/۵ الی ۱۵ میلی‌گرم باعث افزایش کلسی تونین می‌گردد. این هورمون از رهاشدن کلسیم از استخوان‌ها جلوگیری می‌کند و در نتیجه باعث کاهش غلظت کلسیم پلاسما می‌شود. نیمه عمر سرمی کلسی تونین در حدود ۱۲ دقیقه است. علاوه بر افزایش کلسیم پلاسما، هورمون گلوکاگون (Glucagone) و پنتاگاسترین (Panthagastrine) نیز از محرک‌های قوی در ترشح کلسی‌تونین به‌شمار می‌آیند (۱).

کلسی تونین در درمان بیماری پاژت (Pajet)و نیز به‌عنوان دارویی کمکی در افزایش کلسیم خون، پیشگیری و درمان کمکی پوکی استخوان در دوران یائسگی و نیز پوکی استخوان ثانویه ناشی از اختلالات هورمونی، هیپرفسفاتازی و برای درمان کمکی هیپرکلسمی حاد مصرف می‌شود. در بیماری پاژت کلسی تونین با ممانعت اولیه از تحلیل رفتن استخوان، سرعت تجزیه و ساخت استخوانی را حتی‌الامکان کم نموده و سبب کاهش میزان آلکالین فسفاتاز و ترشح هیدروکسی پرولین در ادرار می‌شود. در افزایش کلسیم خون و استئوپروز، کلسی‌تونین با مهار مستقیم تحلیل استخوانی، غلظت کلسیم سرم و تعداد و فعالیت استئوسیت‌ها را کاهش می‌دهد. کلسی تونین همچنین با اثر مستقیم بر کلیه و با واسطه cAMP بازجذب توبولی کلسیم، فسفات و سدیم را مهار نموده و موجب افزایش دفع این عناصر می‌گردد (۲). از این رو کلسی تونین یکی از پپتیدهای مورد توجه در صنعت داروسازی است. این پپتید در موجودات مختلفی از جمله انسان، خوک، ماهی سالمون و مارماهی بیان می‌شود. امروزه با وجود شباهت ساختاری این پپتید در میان گونه‌های مختلف، کلسی تونین با منشا سالمون به دلیل دارا بودن فعالیت ۵۰-۴۰ درصد بیشتر نسبت به کلسی تونین با منشا انسانی، در مقیاس وسیع به عنوان دارو تولید و مصرف می‌شود

(۳).

به‌طور کلی پپتیدهای موردنظر در کنترل فیزیولوژی سلولی و پپتیدهای با خاصیت دارویی به دو شیوه سنتز شیمیایی و بیان تراریختی تولید می‌شوند. معمولاً هزینه تولید پپتیدها با استفاده از روش‌های شیمیایی نسبتاً بالا است. همچنین زنجیره‌های پپتیدی ناقص و آلودگی‌های شیمیایی در محصول نهایی از کیفیت آنها می‌کاهند. این مشکلات در برخی موارد، استفاده از سیستم‌های سنتتیک برای تولید پپتیدها در مقادیر زیاد را محدود می‌کند و در عوض از سیستم‌های اقتصادی‌تر مبتنی بر بیان تراریختی سودجسته می‌شود. از جمله این سیستم‌ها که امروزه برای تولید تجاری ده‌ها پپتید نوترکیب نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ سیستم بیانی باکتری *اشریشیاکلی* است. با این‌حال از آنجا که بیان مستقیم پپتیدهای کوچک در سیستم باکتری بنا به دلایلی از جمله تجزیه مولکول mRNA و ناپایداری پپتید تولیدشده عمدتاً با شکست مواجه می‌شود؛ معمولاً با اتصال واحدهای پپتیدی به یکدیگر و یا اتصال توالی پپتیدی به یک شریک الحاق، می‌توان بیان پپتید مورد نظر را به میزان قابل توجهی افزایش داد (۴). تاکنون بیان پپتید کلسی تونین به دلیل اندازه کوچک و عدم پایداری آن در سیستم‌های زیستی ناموفق بوده است (۵). از این رو به منظور بیان فراوان این پپتید در سیستم‌های زیستی از شریک‌های الحاقی مانند CAT (chloramphenicol acetyl-transferase) یا GST و یا اتصال چندواحد کلسی تونین به صورت مولتی‌مر استفاده شده است. در هریک از این روش‌ها زیرواحدهای پپتیدی پس از بیان و خالص‌سازی از طریق روش‌های شیمیایی و آنزیمی برش یافته و در نهایت پپتید هدف خالص می‌گردد (۵و۶).

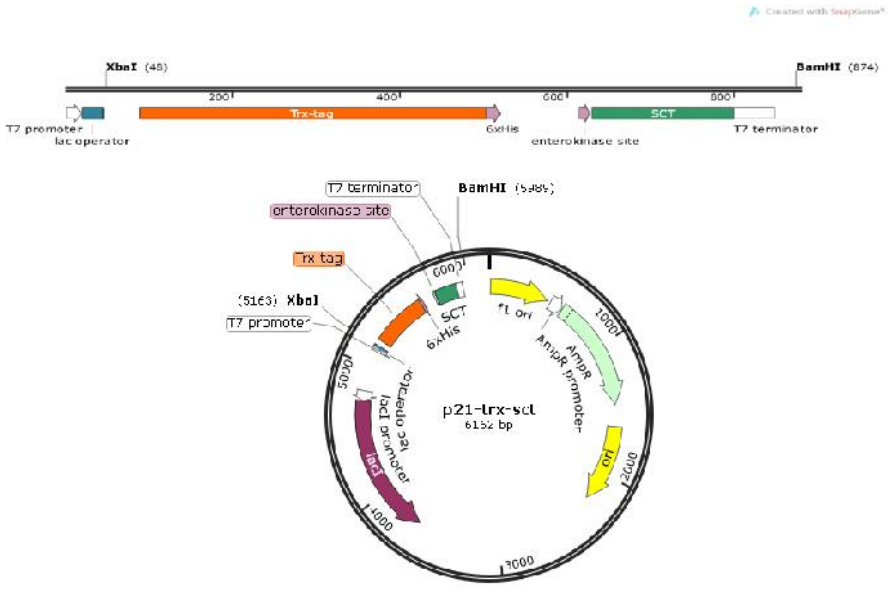
از آنجا که تاکنون بیان پپتید کلسی تونین در اتصال با پروتئین تیوریدوکسین گزارش نشده است؛ در این مطالعه به منظور افزایش بیان و پایداری این پپتید از شریک الحاقی تیوریدوکسین (Trx-tag) بهره گرفته شد.

## روش بررسی

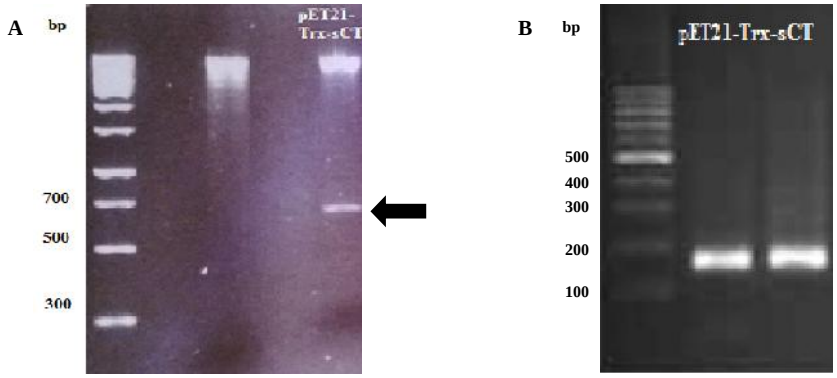
در این مطالعه تجربی توالی مربوط به پپتید کلسی‌تونین و پروتئین تیوردوکسین، از پایگاه اطلاعاتی NCBI و منابع علمی منتشر شده استخراج گردید (۷). بهینه‌سازی توالی کدکننده با استفاده از نرم‌افزارهای Gene Designer v2.0 و RBS Calculator v2.0 انجام شد. توالی نوکلئوتیدی بعد از بهینه‌سازی، برای سنتز و قرارگرفتن در وکتور بیانی pET21(a+) به شرکت Genscript فرستاده شد. ترتیب قرارگیری عناصر سازه ژنی در وکتور بیانی pET21a+ به‌صورت شماتیک در شکل یک نشان داده شد.

به‌منظور انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری مستعد *E. coli* BL21(DE3) از روش شوک حرارتی استفاده شد.

پلاسمیدها طبق دستور شرکت سازنده کیت Qiagene از سلول‌های به‌دست آمده از کشت شبانه استخراج شدند (۸) و آنالیز هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های Xba I و BamH I شرکت Thermo در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت دو ساعت انجام شد. آنالیز PCR بر روی پلاسمیدهای استخراج شده با آغازگرهای اختصاصی Trx-sctF: GCCATCACCATCACCATCA و Trx-sctR: CAGTTTGCCCAGGACACA و شرایط ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۵ ثانیه، سپس یک دقیقه ۹۴ درجه سانتی گراد ، ۴۵ ثانیه ۷۰ درجه سانتی گراد، ۴۵ثانیه ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۵چرخه و به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. به‌منظور بیان فراوان پروتئین نوترکیب، کشت باکتری در فاز لگاریتمی (OD600 ~0.8) با یک میلی‌مولار IPTG القاء گردید.




***شکل ۱ : نمای شماتیک وکتور بیانی حاوی سازه ژنی Trx-sCT***




*شکل ۲ : نتایج برش آنزیمی و PCR پلاسمید استخراج شده در ژل آگارز ۱/۵ درصد*
*A) باند ۷۰۰ جفت بازی در سازه pET21-Trx-sCT نشان‌دهنده حضور قطعه کلسی‌تونین در سازه موردنظر است.*
*B) باند ۱۶۵ جفت بازی نتیجه تکثیر پلاسمید با آغازگرهای طراحی شده است.*

سلول‌ها چهار ساعت پس از القا با استفاده از سانتریفوژ جمع‌آوری و میزان پروتئین آنها با روش SDS-PAGE 18% آنالیز شد. در نهایت مقدار نسبی پروتئین نوترکیب تولید شده با استفاده از نرم‌افزار Image J روی ژل SDS-PAGE تخمین زده شد. در بررسی بیان پپتید کلسی تونین با استفاده از روش وسترن بلات ابتدا پروتئین‌ها براساس وزن مولکولی به‌وسیله ژل SDS-PAG از هم جداشدند. سپس به کاغذ نیتروسلولز با ولتاژ (mA۴۰۰) V۹۰ در مدت زمان ۶۰ دقیقه منتقل شدند. صحت انتقال پروتئین از روی ژل به غشاء نیتروسلولز در مقایسه با ظهور باندهای مارکر پروتئین از پیش رنگ‌شده (pre-satined) تایید گردید. غشاء نیتروسلولز ترانسفر شده در شیر بدون چربی ۵ درصد (حل‌شده در بافر PBS x ۱) به مدت ۱/۵ ساعت بر روی شیکر قرار گرفت و پس از سه مرتبه شستشوی کاغذ با بافر PBS x ۱ هر بار ۵ دقیقه بر روی شیکر در محلول آنتی‌بادی اولیه شرکت سیگما در skim milk ۵درصد در بافر PBS به مدت ۲۴ ساعت درون شیکر انکوباتور با دور ۶۰ RPM و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت کاغذ نیتروسلولز در ۱۵ میلی‌لیتر از محلول آنتی‌بادی پلی‌کلونال ثانویه Goat Anti-Rabit- IgG HRP conjugate به مدت ۱/۵ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر با دور ۶۰ RPM قرار گرفت. سپس از سوبسترای DAB (D-amino banzidine) سیگما (در تریس ۵۰ میلی‌مولار، pH مساوی ۷/۲ و $H_2O_2$) برای مشاهده باندها استفاده شد.

## یافته‌ها

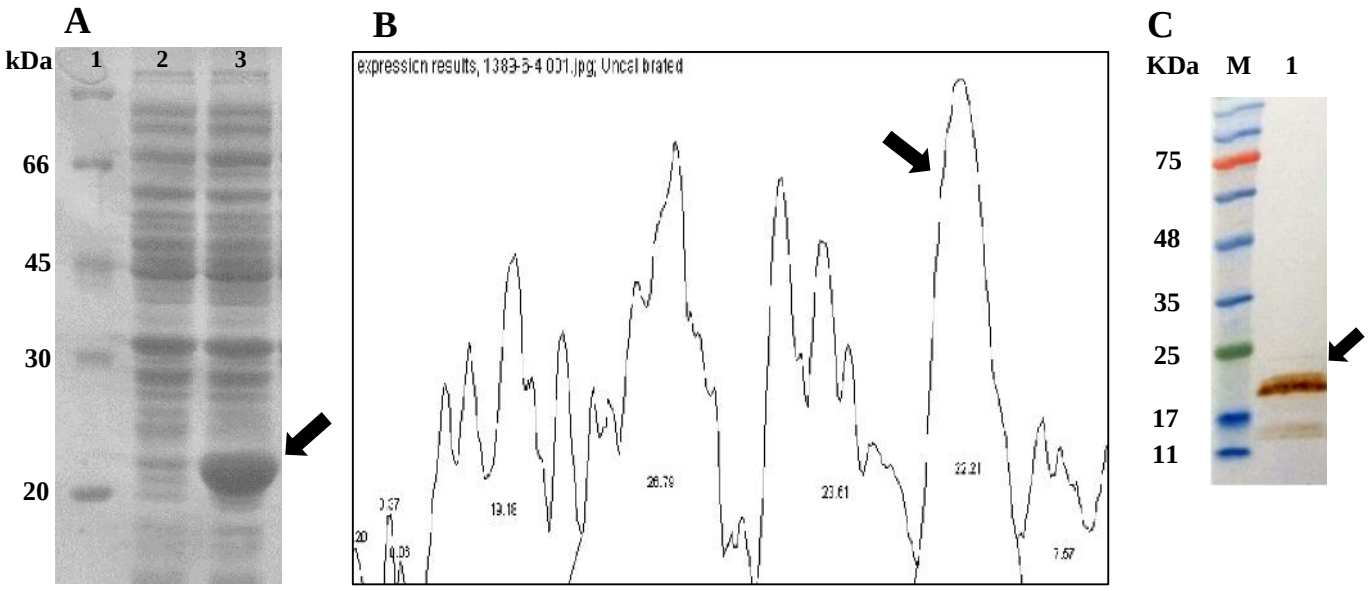
به‌منظور بهبود و افزایش بیان، با استفاده از نرم‌افزار Gene Designer توالی‌های کاندید متعددی طراحی شدند (۸). این توالی‌ها با استفاده از الگوریتم‌های ترجمه معکوس (Back translation) با در نظرگرفتن ترجیح کدونی (Codone preference)، ساختارهای ثانویه mRNA و جایگذاری سایت‌های برشی موردنظر طراحی شدند. در مرحله بعد میزان بیان هریک از توالی‌های طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار تحت شبکه RBS Calculator پیش‌بینی گردید (۹) و در نهایت یک توالی برای سنتز ژن انتخاب شد.

وکتور بیانی pET21-Trx-sCT با استفاده از شوک حرارتی به سلول‌های BL21(DE3) مستعد انتقال یافته و کلونی‌های رشد کرده روی محیط کشت LB-agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سلین ۵۰ میکرومولار برای مرحله غربال انتخاب شدند. حضور قطعه Trx-sCTبا اندازه ۶۸۰ جفت باز در پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از روش برش آنزیمی با آنزیم‌های BamH I و Xba I تایید گردید (شکل ۲-A). همچنین حضور قطعه Trx-sCT در کلونی‌های منتخب با استفاده از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی قطعه تایید شد (شکل ۲-B).

نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین‌ها نشان‌دهنده بیان فراوان پروتئین الحاقی (Fusion protein) Trx-sCT با اندازه حدود ۲۱ کیلو دالتون در نمونه‌های القا شده با IPTG در مقایسه با نمونه کنترل بود (شکل ۳-A). آنالیز ژل با استفاده از نرم‌افزار Imag J نشان داد که پروتئین الحاقی Trx-sCT حدود ۲۲ درصد از کل پروتئین‌های باکتری را به خود اختصاص می‌دهد (شکل ۳-B). همچنین نتایج آنالیز western blot نیز تایید کننده بیان این پروتئین بود (شکل ۳-C).

## بحث

امروزه کلسی‌تونین به دو روش سنتتیک و نوترکیب تولید می‌گردد. در روش سینتتیک سنتز پپتید بر روی فاز جامد یا مایع صورت می‌گیرد. پیچیدگی این روش‌ها با افزایش طول پپتید افزایش می‌یابد و در بسیاری از موارد به دلیل نیاز به مراحل خالص‌سازی متعدد مقرون به صرفه نیست (۱۰).




*شکل ۳ : آنالیز بیان پروتئین با استفاده از روش SDS-PAGE*

*A) الکتروفورز پروتئین‌ها، چاهک شماره ۱: مارکرپروتئینی (LMW-SDS Marker-17044601)، چاهک شماره ۲: کنترل (باکتری حاوی وکتور بدون قطعه موردنظر القا شده با یک میلی مولار IPTG)، چاهک شماره ۳: باکتری حاوی وکتور pET21-Trx-sCT/القا شده با یک میلی‌مولار IPTG، پیکان سیاه مکان پروتئین نوترکیب را نشان می‌دهد*

*B) نتایج آنالیز ژل توسط نرم افزار Imaje J ، پیکان سیاه بخش مربوط به پروتئین نوترکیب را نشان می‌دهد.*

بیان پپتید کلسی تونین به صورت مونومر به دلیل ناپایداری آن در سیستم باکتری ناموفق است (۵). سالمون کلسی‌تونین نوترکیب تولید شده در باکتری *اشریشیاکلی* اولین بار در سال ۱۹۹۹ با نام تجاری Forcaltin با کسب مجوز بالینی از FDA راهی بازار شد. در این مطالعه کلسی تونین به همراه شریک الحاقی GST بیان شد و پس از برش آنزیمی تخلیص گردید (۶). در مطالعه دیگر این پپتید به صورت مولتی‌مری از تکرارهای کلسی تونین انسانی بیان شد و پس از خالص‌سازی به وسیله برش آنزیمی جدا گردید و خالص‌سازی نهایی انجام شد (۵). تاکنون شریک‌های الحاق متنوعی برای بیان و خالص‌سازی پروتئین‌ها در دسترس بوده‌اند. از میان شریک‌های الحاقی مورد استفاده در افزایش حلالیت، تیوریدوکسین به عنوان یکی از بهترین شریک‌های الحاقی برای افزایش بیان و نیز افزایش حلالیت پروتئین‌های نوترکیب بسیاری به‌کار رفته است (۱۱). اندازه کوچک (۱۹ کیلو دالتون) و ساختار پایدار تیوریدکسین از جمله ویژگی‌های بارز آن است. از آنجا که تاکنون استفاده از این شریک الحاق برای بیان فراوان کلسی تونین گزارش نشده است؛ در این مطالعه اتصال تیوریدکسین در انتهای آمین یک واحد کلسی‌تونین برای بیان فراوان این پپتید استفاده شد. نتایج نشان دادند که با افزودن توالی تیوردوکسین به سازه ژنی موردنظر، پروتئین نوترکیب (۲۲/۸ کیلودالتون) به صورت پایداری در باکتری بیان شده و تقریباً ۲۲ درصد کل پروتئین‌های سلولی را به خود اختصاص می دهد. از آنجا که پپتید کلسی تونین تنها ۱۲ درصد از پروتئین الحاقی را به خود اختصاص می‌دهد؛ لذا پیش‌بینی می‌شود پپتید کلسی‌تونین حدود ۵ درصد از کل پروتئین‌های سلولی را به خود اختصاص داده است. بر این اساس و با توجه به مدل‌های تخمینی موجود میزان تولید کلسی تونین نوترکیب با این روش حدود ۸ میلی‌گرم در لیتر در واحد OD خواهد بود که این میزان در مقایسه با مطالعات قبلی ۷/۷ میلی‌گرم (۵) و ۱/۳ میلی‌گرم (۶) بالاتر است.

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه سازه ژنی حاوی پپتید دارویی کلسی تونین سالمون در اتصال با شریک الحاقی تیوریدکسین همسانه‌سازی گردید. در طراحی این سازه ژنی از روش‌های بیوانفورماتیک برای به حداکثر رساندن بیان بهره‌گیری شد. نتایج الکتروفورز و نیز وسترت بلات نشان داد که پروتئین الحاقی به صورت پایداری بیان شده و تقریباً ۲۲ درصد کل پروتئین‌های سلولی را به خود اختصاص داده است. براساس مدل‌های تخمینی موجود میزان تولید پروتئین الحاقی و پپتیدکلسی تونین نوترکیب با این روش به ترتیب حدود ۳/۵ گرم و ۰/۸گرم در لیتر در ۱۰۰ OD خواهد بود که این میزان در مقایسه با مطالعات قبلی بالاتر است.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۳۹) خانم زینب پورهاشم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی پزشکی از دانشکده فن‌آوری‌های نوین دانشگاه علوم پزشکی گلستان و نیز طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۸۳۸۱۶) معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود.

## References


1. Visser EJ. A review of calcitonin and its use in the treatment of acute pain. Acute Pain. 2005; 7(4): 185-89. http://dx.doi.org/ 10.1016/j.acpain.2005.09.003

2. Pharmacopoeia B. British Pharmacopoeia Commission London; the Department of Health. Soc Serv Public Saf. 2013; 1: 719-20.

3. Kim KH, Seong BL. Peptide amidation: Production of peptide hormonesin vivo andin vitro. Biotechnol Bioprocess Eng. 2001; 6(4): 244-51. doi: 10.1007/BF02931985

4. Gellissen G. Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell. 2005; pp: 11-34.

5. Ishikawa H, Tamaoki H. Production of human calcitonin in Escherichia coli from multimeric fusion protein. J Ferment Bioeng. 1996; 82(2): 140-44. http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X(96)85036-7

6. Ray MV, Van Duyne P, Bertelsen AH, Jackson-Matthews DE, Sturmer AM, Merkler DJ, et al. Production of recombinant salmon calcitonin by in vitro amidation of an Escherichia coli produced precursor peptide. Biotechnology (N Y). 1993 Jan; 11(1): 64-70.

7. Villalobos A, Ness JE, Gustafsson C, Minshull J, Govindarajan S. Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments. BMC Bioinformatics. 2006 Jun; 7: 285.

8. Sample & Assay Technologies QIAGEN. QIAprep ® Miniprep Handbook For purification of molecular biology grade DNA. May 2012.

9. Salis HM. The ribosome binding site calculator. Methods Enzymol. 2011; 498: 19-42. doi: 10.1016/B978-0-12-385120-8.00002-4.

10. Arabanian A, Mohammadnejad M, Balalaie S. A novel and efficient approach for the amidation of C-terminal peptides. Journal of the Iranian Chemical Society. 2010 Dec; 7(4): 840-45. doi: 10.1007/BF03246077

11. Balbas P, Lorence A. Recombinant gene expression: reviews and protocols. 2nd ed. New York: Humana Press. 2004.

**Original Paper**

# Heterologous expression of Salmon Calcitonin in *Escherichia coli*

**Pourhashem Z (M.Sc)[1], Abbasian M (M.Sc)[2], Shahbazi M (Ph.D)[3], Yamchi A (Ph.D)*[4]**

**[1]M.Sc in Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Medical Sciences Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. [2]M.Sc in Biotechnology, Faculty of Agricultural Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. [3]Associate Professor, Head of Cellular and Molecular Research, Center of Taleghani Hospital, Golesatn University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. [4]Assistant Professor, Genetic Engineering and Molecular Genetics, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.**

## Abstract

**Background and Objective:** Calcitonin is a small peptide hormone including 32 amino acids and 3.4 KD molecular weight which is produced by the parafollicular cells of the thyroid gland in respond to increasing calcium ions in serum. This peptide is used for adjuvant therapy of osteoporosis, Paget's disease and hypercalcemic shock. In this study, the heterologuse expression of calcitonin was done in *Escherichia coli.*

**Methods:** In this experimental study, the thioredoxin fusion partner was added to n-terminal of the Salmon calciton in order to increase its stability by the synthetic biology. The recombinant construct was transformed and over expressed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) host cell.

**Results:** SDS-PAGE analysis showed the over expression of recombinant protein after IPTG induction.

**Conclusion:** In this study, the construct including fused Salmon calcitonin gene with thioredoxin was cloned. The SDS-PAGE result showed the stable expression of fused calcitonin.

**Keywords:** Calcitonin, Thioredoxin fusion tag, Over expression, Peptide hormone

*** Corresponding Author: Yamchi A (Ph.D), E-mail: yamchi@gau.ac.ir**

**Received** 8 Feb 2016 **Revised** 14 Mar 2016 **Accepted** 14 Mar 2016

Cite this article as: Pourhashem Z, Abbasian M, Shahbazi M, Yamchi A. [Heterologous expression of Salmon Calcitonin in *Escherichia coli*]. J Gorgan Uni Med Sci. Spring 2017; 19(1): 77-82. [Article in Persian]