

کاربرد کوچک مولکول‌ها (Small molecules) در مهندسی بافت عضله اسکلتی

بهناز میرزا احمدی^۱، محمود تلخابی^{۲*}، سارا رجبی^{۳*}

مقاله مروری

مقدمه: حدود ۴۰٪ از وزن بدن انسان را بافت عضله اسکلتی تشکیل می‌دهد. سالانه صدها نفر دچار از دست رفتن بافت عضلانی به عللی چون بیماری، جنگ و تصادف‌ها می‌شوند که این مسئله می‌تواند منجر به اختلال در اعمالی مانند تنفس و حرکت و زندگی اجتماعی فرد شود. تاکنون روش‌هایی چون دارودرمانی، سلول درمانی و پیوند بافت برای کنترل آسیب‌های بافت عضلانی و بازسازی آن مورد مطالعه قرار گرفته است. اگرچه در حال حاضر روش درمانی مشخص و کارآمدی برای درمان آسیب‌های عضلانی وجود ندارد و بسیاری از بیماران شدت ضایعات عضلانی با افزایش سن بیشتر می‌شود. بنابراین تحقیق برای پیدا کردن رویکردهای درمانی جدید و کارآمد برای ترمیم عضله یکی از مباحث مهم در علوم پایه و پزشکی می‌باشد. مهندسی بافت یکی از روش‌های امیدوارکننده و نوین در ترمیم بافت عضله اسکلتی در نظر گرفته می‌شود که نوید ساخت بافت‌های عضلانی عملکردی، ساخت مدل مناسب جهت پزشکی شخص محور و مدل پژوهشی برای تحقیقات پایه را می‌دهد. فاکتورهای القایی در کنار زیست مواد و سلول، عناصر اصلی مهندسی بافت هستند. این فاکتورها معمولاً به واسطه مکانیزم‌های اپی‌ژنتیکی و تاثیر بر مسیرهای پیام‌رسانی باعث القاء تکثیر، تمایز و مهاجرت سلول‌های مورد استفاده در مهندسی بافت عضله شده و ساخت یک بافت عضلانی در شرایط آزمایشگاهی را تسریع می‌کنند. به تازگی، کوچک مولکول‌ها نیز به صورت مستقل (به جای فاکتورهای رشد) و یا در کنار فاکتورهای رشد در مهندسی بافت عضله به کار رفته‌اند. از آنجایی که کوچک مولکول‌ها پاسخ ایمنی ایجاد نکرده، به آسانی وارد سلول شده و هدف مولکولی مشخصی دارند و لذا به عنوان فاکتورهای القایی مناسب در مهندسی بافت، مورد توجه قرار گرفته‌اند.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی کوچک مولکول‌های موثر در مهندسی بافت عضله می‌توانند با حالت‌های مختلف زیست مواد (هیدروژل، بافت سلول‌زدایی شده و داربست‌های سنتزی) به کار روند و قابلیت استفاده در شرایط *In vitro* و *In vivo* را دارند و در نتیجه باعث تولید بافت عضلانی با کارایی بالاتر شده، و هزینه تولید بافت عضله را کاهش داده که این مسئله به پیشبرد اهداف درمانی مهندسی بافت عضله کمک می‌کند. در این مقاله، مهندسی بافت عضله اسکلتی و نقش کوچک مولکول‌ها در آن مورد بررسی قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: پزشکی بازساختی، مهندسی بافت عضله، کوچک مولکول، اپی‌ژنتیک، پیام‌رسانی سلولی

ارجاع: بهناز احمدی میرزا، تلخابی محمود، رجبی سارا. کاربرد کوچک مولکول‌ها (Small molecules) در مهندسی بافت عضله اسکلتی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۹؛ ۲۸ (۱۱): ۷۷-۳۱۶۴.

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

۳- استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه فناوری نانو و زیست‌مواد، تهران، ایران.

* (نویسندگان مسئول): تلفن: ۰۹۱۹۵۵۷۱۷۸۵، پست الکترونی: m_talkhabi@sbu.ac.ir و srajabi@royaninstitute.org صندوق پستی: ۱۶۶۵۶۵۹۹۱۱

تعداد اهداکننده بافت و احتمال بالای رد بافت برای همه افراد و نیز برای همه نوع آسیب عضلانی قابل استفاده نیست (۹). (۱۰). سلول درمانی و مهندسی بافت از رویکردهای نوین و امیدوار کننده در ترمیم بافت عضله اسکلتی هستند. در روش سلول درمانی، سلول‌ها به ناحیه آسیب تزریق می‌شوند و تاکنون سلول‌های مختلفی از جمله سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های ماهواره‌ای و پریشیت‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۱). هرچند نیاز به تعداد بسیار زیاد سلول برای تزریق و کاهش بقاء سلول‌های تزریق شده از جمله چالش‌های سلول درمانی می‌باشد (۹). با توجه به اینکه در آسیب‌های عضلانی، بافت عضله دچار آسیب می‌شود لذا ساخت بافت عضله عملکردی و پیوند آن می‌تواند یک روش درمانی مناسب برای ترمیم آسیب‌های عضلانی باشد. امروزه "مهندسی بافت" این امکان را فراهم کرده است تا پژوهشگران بتوانند بافت‌ها و اندام‌ها را در محیط آزمایشگاه طراحی کرده و بسازند. مهندسی بافت بر سه عنصر اصلی شامل زیست مواد، سلول و فاکتورهای رشد/تنظیمی استوار است. زیست مواد چارچوب بافت مورد نظر را فراهم و نقش ماده زمینه خارج سلولی را ایفا کرده و شرایط بیوفیزیکی و بیوشیمیایی برای مهاجرت، تقسیم و تمایز سلول‌ها را فراهم می‌کند (۱۲). تاکنون انواعی از زیست مواد مثل سرامیک‌ها، پلیمرهای سنتزی و یا طبیعی در مهندسی بافت استفاده شده است (۱۳، ۱۴). فاکتورهای القایی به‌عنوان عوامل تحریک‌کننده و القایی عمل کرده و از راه‌های مختلفی از قبیل مسیرهای پیام‌رسانی رفتار و عملکرد سلول‌ها مانند تکثیر، تمایز و مهاجرت را کنترل و تنظیم می‌کنند (۱۵). سلول‌ها خشت‌های مهندسی بافت هستند که بعد از قرار گرفتن در زیست مواد مورد استفاده باعث شکل‌گیری بافت می‌شوند. تاکنون انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی و تمایز یافته به‌صورت اتولوگ و الوژنیک در مهندسی بافت استفاده شده‌اند (۱۶).

روش بررسی

در این مطالعه ابتدا کلیدواژه‌های پزشکی باز ساختی (Regenerative medicine)، مهندسی بافت عضله (Muscle tissue engineering) و کوچک مولکول (Small molecules) در این مطالعه

سالانه صدها نفر در دنیا دچار بیماری‌های عضله اسکلتی می‌شوند. علی‌رغم پتانسیل بالای عضله اسکلتی برای ترمیم خود، از بین رفتن بیش از ۲۰٪ از بافت یک عضله ایجاد نقص می‌کند (۱). علل گوناگونی از جمله نقایص مادرزادی، تصادف‌ها، بیماری، عفونت و جنگ موجب این مسئله شده و در کشورهای درگیر جنگ، نیروهای نظامی و ورزشکاران شیوع بیشتری دارد. دیستروفی عضلانی دوشن و بکر با احتمال ۱ در هر ۳۵۰۰ نوزاد پسر (۲)، دیستروفی عضلانی امری-دریفوس با احتمال ۱ در ۱۰۰,۰۰۰ نفر (۳) و دیستروفی میوتونیک با احتمال ۱ در ۸۰۰۰ نفر (۴) نمونه‌هایی از بیماری‌های ارثی عضله اسکلتی می‌باشند. علاوه بر این سالانه تنها در آمریکا حدود ۱/۵ میلیون نفر به‌واسطه عفونت، عوارض دیابت، سرطان، ضربات به عضله و بیماری اعصاب-عضله، متحمل آسیب‌های شدید بافت عضلانی می‌شوند (۵). در کنار تمام این بیماری‌ها و مشکلات، بالا رفتن سن در افراد باعث کاهش پتانسیل ترمیم عضله اسکلتی می‌شود (۶). چنانچه آسیب‌های وارد شده به بافت عضله اسکلتی قابل ترمیم باشند، سلول‌های ایمنی بعد از بروز آسیب به‌محل ضایعه جذب شده و علاوه بر پاک‌سازی محل، به‌وسیله مکانیزم‌های مختلف از قبیل ترشح سایتوکاین‌ها موجب فعال‌سازی سلول‌های بنیادی عضله (سلول‌های ماهواره‌ای) می‌شوند (۷). این سلول‌ها که قبل از آسیب به‌صورت خاموش بودند، بعد از فعال‌سازی به میوبلاست تمایز پیدا کرده و در ادامه با یکدیگر ادغام شده و فیبرهای چند هسته‌ای را به‌وجود می‌آورند. این سلول‌ها هم‌چنین می‌توانند با فیبرهای موجود در محل نزدیک آسیب ترکیب شوند (۸). اما اگر شدت آسیب زیاد باشد مکانیزم فوق جوابگوی ترمیم عضله اسکلتی نبوده و در این شرایط فیبروبلاست‌ها به‌محل آسیب وارد شده و اسکار ایجاد می‌کنند. تاکنون راهکارهای مختلفی از جمله سلول درمانی، ژن درمانی، ورزش درمانی و پیوند برای درمان بیماری‌های عضله اسکلتی به‌کار رفته است. اما این راه کارها تاکنون با چالش‌هایی مواجه بوده و خیلی موفقیت‌آمیز نبوده‌اند. برای مثال درمان به‌واسطه پیوند، به‌خاطر کافی نبودن

بیوفیزیکی و بیوشیمیایی ماده زمینه خارج سلولی و تاثیر آن بر سلول‌ها و روند ترمیم بافت را تقلید کند.

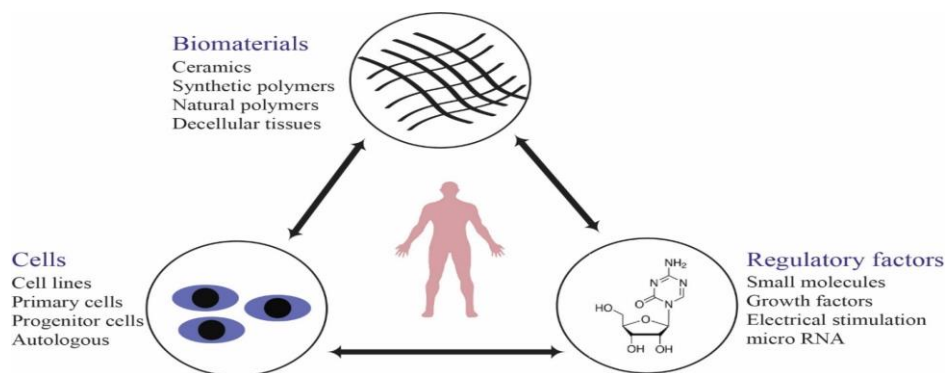
۲) ساخت محصولات قابل پیوند بدون ایجاد پاسخ ایمنی، از این‌رو به‌وسیله مهندسی بافت میتوان هزینه توسعه دارو و آزمایش‌ها روی حیوانات را کاهش داد. اما در این روش چند مسئله پیش رو است از جمله: ۱) رساندن فاکتورهای شیمیایی برای القای رشد و تمایز سلول‌های بنیادی و طول زمانی که این فاکتور را در محیط پیوند باقی می‌مانند. ۲) رشد و مهاجرت سلول‌ها ۳) زیست تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری زیست مواد پیوند شده (۱۷). مهندسی بافت عضله اسکلتی ترکیبی از علومی چون مهندسی، سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی است و بر عناصر اصلی مهندسی بافت تکیه دارد (شکل ۱). در این رشته دو راهبرد درون‌تنی (*in vivo*) و برون‌تنی (*in vitro*) وجود دارد که در روش برون‌تنی بافت عضلانی مهندسی شده خارج از بدن ساخته و سپس به بدن فرد پیوند زده می‌شود و البته می‌تواند به‌عنوان بستری برای غربالگری دارو نیز به‌کار رود. ولی در روش درون‌تنی عناصر مهندسی بافت عضله به بدن شخص تزریق می‌شود و عضله عملکردی در بدن فرد ساخته می‌شود (۱۸). در سال‌های اخیر فناوری‌هایی مانند پرینت ۳ بعدی به پیشرفت و پیشبرد اهداف مهندسی عضله اسکلت کمک کرده‌اند.

در سایت NCBI (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) جستجو شدند. سپس مقالات تحقیقی و نیز مروری که از سال ۲۰۱۰ به بعد چاپ شده بودند و تمرکزشان بر استفاده از کوچک مولکول‌ها در مهندسی بافت عضله اسکلتی (در شرایط درون تنی و برون تنی) بود، انتخاب شدند. در مقالات انتخاب شده، نوع کوچک مولکول مطالعه شده، نقش و مکانیزم اثر کوچک مولکول در مهندسی بافت عضله مورد بررسی قرار گرفت. برای یافتن ساختار مولکولی کوچک مولکول‌ها از یکی از پایگاه‌های تخصصی کوچک مولکول‌ها (<https://www.sellckchem.com/>) استفاده شد. در نهایت مجموعه گسترده‌ای از کوچک مولکول‌های موثر در مهندسی بافت عضله اسکلتی در یک جدول به‌همراه ساختار شیمیایی و عملکرد آن‌ها دسته‌بندی شد.

مهندسی بافت عضله اسکلتی

یکی از روش‌های نوین در زمینه درمان بیماری‌های عضله اسکلتی مهندسی بافت است که چشم‌انداز روشنی برای درمان نقایص و آسیب‌های عضلانی داشته و رویکرد پژوهشگران در آن ساخت عضله اسکلتی با قابلیت انقباض هماهنگ فیبرهای آن و از نظر متابولیسمی فعال است. دو هدف مهم برای مهندسی بافت ماهیچه اسکلتی وجود دارد:

۱) توسعه مدل‌های پژوهشی مانند اندام تراشه‌ای که در غربالگری دارو، پژوهش‌های پایه و تشریح مکانیسم‌های پیچیده استفاده می‌شود. برای مثال کشف زیست موادی که شرایط



شکل ۱: فاکتورهای اساسی مهندسی بافت عضله اسکلتی

خاصی عبور می‌کنند. اخیراً فاکتورهای فیزیکی از جمله توپوگرافی زیست مواد، تحریک الکتریکی عضله، فشار و کشش در مهندسی بافت نیز مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. برای مثال، مشخص شده است که تحریک الکتریکی باعث افزایش تقسیم و ادغام سلول‌های ماهواره‌ای می‌شود (۲۴). نقش فاکتورهای رشد در بسیاری از مراحل تکوین و ترمیم عضله مشخص شده و مورد بررسی قرار گرفته است. این فاکتورها ساختار پروتئینی داشته از طریق فعال کردن مسیرهای پیام‌رسانی سلولی نقش خود را در تکوین عضله بازی می‌کنند. IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) ، SDF-1 (Stromal Cell Derived Factor 1) و FGF (Fibroblast growth factor) از مهم‌ترین فاکتورهای رشد در تکوین عضله بوده که در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۵). SDF-1 و IGF-1 به ترتیب باعث القاء مهاجرت (۲۶) و تکثیر سلول‌های بنیادی عضله می‌شوند (۲۷). هم‌چنین مشخص شده است که استفاده همزمان IGF-1 و VEGF (Vascular endothelial growth factor) موجب افزایش فرایند میوزن شده و رگ زایی را القاء می‌کند (۲۸). اما استفاده از فاکتورهای رشد در بافت مهندسی شده معایبی چون ایجاد پاسخ ایمنی، هزینه و تکنولوژی بالای ساخت، نیمه عمر پایین و تخریب سریع، از دست دادن عملکرد زیستی و اثرات جانبی طولانی‌مدت دارد (۲۹). با توجه به اینکه مسیر پیام‌رسانی فاکتورهای رشد مشخص بوده و فاکتورهای دخیل در هر مسیر و نیز در فرایند میوزن مشخص است، بنابراین فعال کردن این مسیرها و فاکتورها با استفاده از کوچک مولکول‌ها می‌تواند یک رویکرد مناسب برای جایگزین کردن نقش فاکتورهای رشد در مهندسی بافت عضله می‌باشد.

کوچک مولکول‌ها (Small molecules)

کوچک مولکول‌ها دسته مهمی از فاکتورهای شیمیایی هستند که کمتر از ۱۰۰۰ دالتون وزن داشته (۳۰) و می‌توانند به راحتی از غشاء سلولی عبور کرده و به سلول وارد شوند. این مولکول‌ها به دلیل اندازه‌شان پاسخ ایمنی ایجاد نکرده، هزینه ساخت کمتری دارند، ریسک آلودگی بین گونه‌ای را کاهش

زیست مواد در مهندسی بافت عضله اسکلتی

عضله اسکلتی طبیعی داربست ویژه‌ای دارد که از تمایز، بقاء و عملکرد سلول‌ها و فیبرهای عضلانی حمایت کرده و دارای کشسانی کافی است. بنابراین زیست مواد مورد استفاده در مهندسی بافت عضله اسکلتی نیز باید بتوانند نقش داربست عضله را بازی کنند. تاکنون انواع مختلفی از هیدروژل‌ها، نانوفیبرها و داربست‌ها برای مهندسی بافت عضله اسکلتی استفاده شده‌اند. در بافت نرمی مثل عضله می‌توان از پلیمرهای طبیعی چون کلاژن، فیبرین و یا ژلاتین که در ماده زمینه خارج سلولی این بافت وجود دارند استفاده کرد (۱۳). زیست مواد طبیعی امکان اتصال بهتر به فاکتورهای رشد و کوچک مولکول‌ها را داشته و از این عوامل و نیز سلول‌ها حمایت بیشتری به عمل می‌آورد. هم‌چنین زیست مواد طبیعی، زیست سازگاری و زیست تخریب‌پذیری بهتری نسبت به پلیمرهای سنتزی دارد (۱۹، ۲۰).

سلول در مهندسی بافت عضله اسکلتی

در بافت عضله اسکلتی فیبرهای عضلانی و سلول‌های ماهواره‌ای به ترتیب سلول‌های عملکردی اصلی و سلول‌های حامی بافت می‌باشند. سلول‌های ماهواره‌ای می‌توانند در شرایط خاص فاکتورهای نسخه‌برداری *MyoD*، *Pax7* و *MYOG* را بیان کرده و به سلول‌های عضلانی تمایز پیدا کرده و فیبرهای عضلانی را به وجود بیاورند. بنابراین چنانچه در مهندسی بافت عضله از سلول‌های بنیادی میوزنیک یا غیرمیوزنیک استفاده شود (۲۱)، این سلول‌ها باید توانایی تمایز به عضله را داشته باشند. تاکنون علاوه بر سلول‌های ماهواره‌ای که به‌عنوان اولین منبع سلول‌های میوزنیک در مهندسی بافت عضله استفاده می‌شوند (۲۲)، سلول‌های غیر میوزنیک از قبیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و مایع آمنیون نیز مورد بررسی قرار گرفته و مورد توجه پژوهشگران می‌باشند (۲۳).

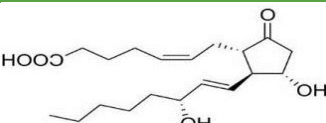
فاکتورهای القایی در مهندسی بافت عضله اسکلتی

در تکوین طبیعی عضله، سلول‌های مزودرمی تحت انواع مکانیزم‌های القایی از جمله فشارهای مکانیکی (فاکتورهای فیزیکی) و فاکتورهای رشد قرار گرفته و از مراحل تکوینی

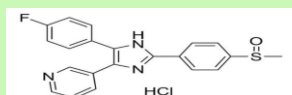
می‌دهند و شرایط زیستی و شیمیایی ساخت آن‌ها قابل کنترل است (۳۱). این مولکول‌ها با هدف مهار کردن یا فعال کردن یک فاکتور خاص در سلول سنتز می‌شوند. بنابراین با هدف قرار دادن فاکتورهای خاص از قبیل گیرنده‌ها، آنزیم‌ها، فاکتورهای نسخه‌برداری و تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی، می‌توانند تکثیر، تمایز و مهاجرت سلول‌های دودمان عضله را کنترل کرده و بازده مهندسی بافت عضله را بهبود بخشند (جدول ۱). بیشتر کوچک مولکول‌های موثر در مهندسی بافت عضله از طریق هدف قرار دادن «مسیرهای پیام‌رسانی» یا «فاکتورهای اپی‌ژنتیکی» نقش خود را ایفا می‌کنند. مسیر پیام‌رسانی Wnt از مسیرهای مهم در مراحل ابتدایی و انتهایی تکوین عضله است. کوچک مولکول‌های CHIR99021 و BIO با مهار کردن GSK3B (یکی از فاکتورهای اصلی مسیر Wnt) باعث فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی Wnt شده و عملکرد فاکتورهای ترشحی Wnt را تقلید می‌کنند. این کوچک مولکول‌ها در شرایط درون‌تنی و برون‌تنی باعث تمایز عضلانی می‌شوند (۴۸). همان‌طور که در بالا اشاره شد فاکتور رشد SDF-1 باعث هدایت سلول‌های بنیادی عضله شده و تکثیر این سلول‌ها را افزایش می‌دهد (۲۶). اخیراً نشان داده شده که کوچک مولکول Diprotin A با مهار کردن آنزیم DPP-4 (dipeptidyl peptidase 4) از تخریب SDF-1 جلوگیری کرده و موجب افزایش سطح SDF-1 و در نتیجه افزایش هدایت و جذب سلول‌های بنیادی به محل آسیب می‌شود (شکل ۲) (۴۹). از طرفی مشخص شده است که کوچک مولکول‌های CK-

2066260 و CK-201735 با افزایش حساسیت سارکومرهای فیبرهای سریع عضله اسکلتی به کلسیم و افزایش تولید نیرو موجب افزایش عملکرد سلول‌های عضلانی می‌شوند و کوچک مولکول CK-2127107 می‌توانند نشانه‌های بیماری (ALS) Amyotrophic lateral sclerosis را در شرایط درون‌تنی بهبود ببخشند (۳۴). کوچک مولکول‌هایی که از طریق مکانیزم‌های اپی‌ژنتیکی عمل می‌کنند بیشتر آنزیم‌های هیستون داستیلاز (Histone deacetylase یا HDAC) و آنزیم DNA متیل ترانسفراز (DNA methyltransferase یا DNMT) را هدف قرار می‌دهند. مهار این آنزیم‌ها باعث افزایش بیان ژن‌های ویژه عضله از جمله MyoD شده و میوژنز را القاء می‌کنند. کوچک مولکول‌هایی چون valproic acid (VPA)، sodium butyrate، Trichostatin (TSA) با مهار آنزیم HDAC و ممانعت از فشرده شدن کروماتین باعث رونویسی MyoD می‌شوند و تقسیم و تمایز سلول بنیادی عضلانی را القاء می‌کنند (۴۰). کوچک مولکول 5-Azacytidine با جلوگیری از فعالیت DNMT موجب می‌شود ژن MyoD و چندین ژن ویژه عضله بیان شده و تکثیر سلول‌های بنیادی عضله اسکلتی و رده سلولی C2C12 را افزایش می‌دهد (۵۰). در یکی از مطالعات اخیر مشخص شده است که این کوچک مولکول باعث القاء میوژنز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده در داربست ژلاتین شده و استفاده از آن در شرایط درون‌تنی میوژنز و رگ‌زایی را افزایش می‌دهد (۵۱).

جدول ۱: کوچک مولکول‌های موثر در مهندسی بافت عضله اسکلتی

مرجع	ساختار	کاربرد	کوچک مولکول
(۳۲)		تکثیر میوبلاست‌ها و تمایز در محیط کشت را القا می‌کند.	Prostaglandin E2

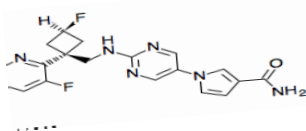
(۳۳)



سلول‌های ماهیچه‌ای را تمایززدایی کرده و موجب تشکیل میوبلاست می‌شود.

SB203580

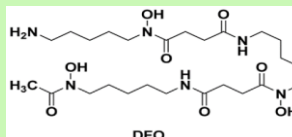
(۳۴)



نشانه‌های بیماری‌های آتروفی عضلانی نخاعی و اسکروز جانبی آمیوتروفیک را بهبود می‌بخشند.

Reldesemtiv

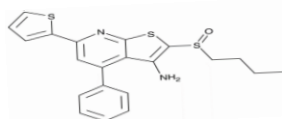
(۳۵)



باعث تحریک رگ‌زایی در ماهیچه اسکلتی مهندسی شده می‌شود.

Deferoxamine (DFO)

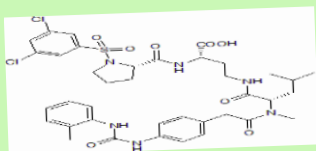
(۱)



باعث افزایش بیان ژن‌های مربوط به تمایز عضله اسکلتی می‌شود.

SW033291

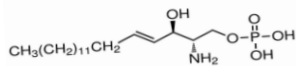
(۳۳)



سلول‌های ماهیچه‌ای را تمایز زدایی کرده و موجب تشکیل میوبلاست می‌شود.

BIO

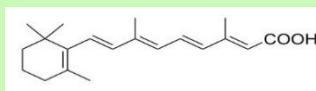
(۳۶)



در تحرک سلولی، بقاء، آنژیوژنز، ترمیم عضلات، تکثیر سلول ماهواره‌ای و تمایز میوبلاست نقش دارد.

S1P

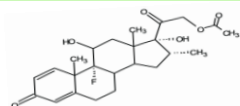
(۷)



میوژنز را از طریق مسیر پیام‌رسانی AMPK-p38 MAPK تقویت می‌کند.

Retinoic acid

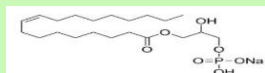
(۳۷)



در دوز و زمان بالا باعث تولید نیرو شده و خصوصیات ساختاری عضله اسکلتی مهندسی شده را بهبود می‌بخشد.

Dexamethasone (DEX)

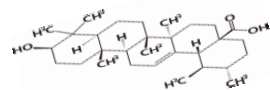
(۳۸)



وارد شدن سلول‌های C2C12 به بافت مهندسی شده را تحریک و القاء می‌کند.

Lysophosphatidic acid

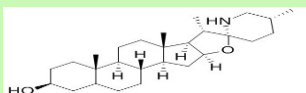
(۳۹)



آتروفی عضله را مهار می‌کند.

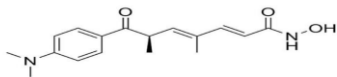
Ursolic acid

(۳۹)



Tomatidine آتروفی عضله را مهار می‌کند.

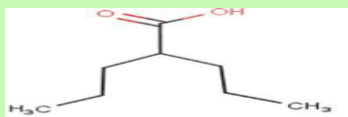
(۴۰)



موجب افزایش نیروی انقباضی بافت عضلانی اسکلتی مهندسی شده (به واسطه میوبلاست موشی) می‌شود.

Trichostatin (TSA)

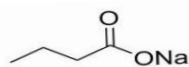
(۴۰)



موجب القاء افزایش چشمگیر شکل‌گیری میوتوب‌ها در حالت ۲ بعدی و افزایش پهنای میوتوب‌ها در حالت ۳ بعدی می‌شود.

Valproic acid (VPA)

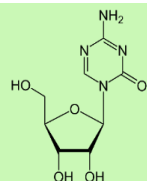
(۴۰)



باعث افزایش شکل‌گیری میوتوب می‌شود.

sodium butyrate (SB)

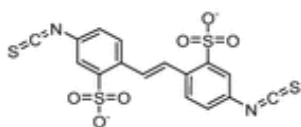
(۴۱)



باعث روشن‌شدن ژن‌های مربوط به تمایز و تکثیر سلول‌های ماهیچه اسکلتی می‌شود.

5-azacytidine

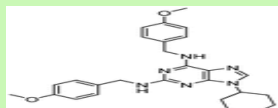
(۳۸)



سلولی‌شدن بافت عضله مهندسی شده را القاء می‌کند (افزایش حضور و عملکرد سلول‌ها در داربست و مشاهده بافت مهندسی شده پر از سلول).

DIDS (5-isothiocyanato-2-[2-(4-isothiocyanato-2-sulfophenyl) ethynyl] benzene-1-sulfonic acid)

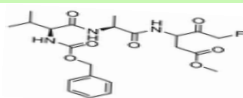
(۳۸)



سلولی‌شدن بافت عضله مهندسی شده را القاء می‌کند.

Myoseverin

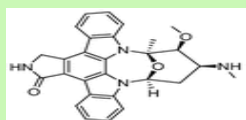
(۳۸)



سلولی‌شدن بافت عضله مهندسی شده را القاء می‌کند.

Z-VAD

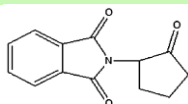
(۳۸)



سلولی‌شدن بافت عضله مهندسی شده را القاء می‌کند.

Staurosporine

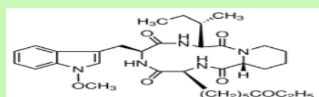
(۴۲)



رگ‌زایی را القاء کرده و از مرگ سلول‌های اندوتلیال رگ ممانعت می‌کند.

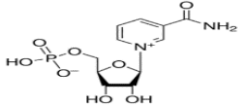
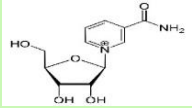
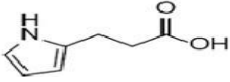
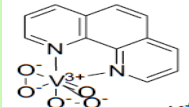
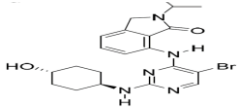
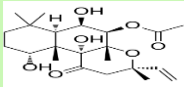
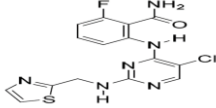
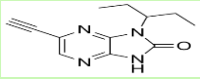
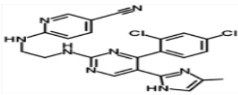
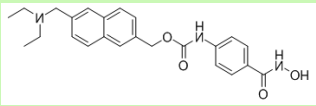
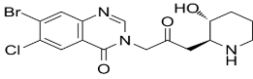
SC-3-149

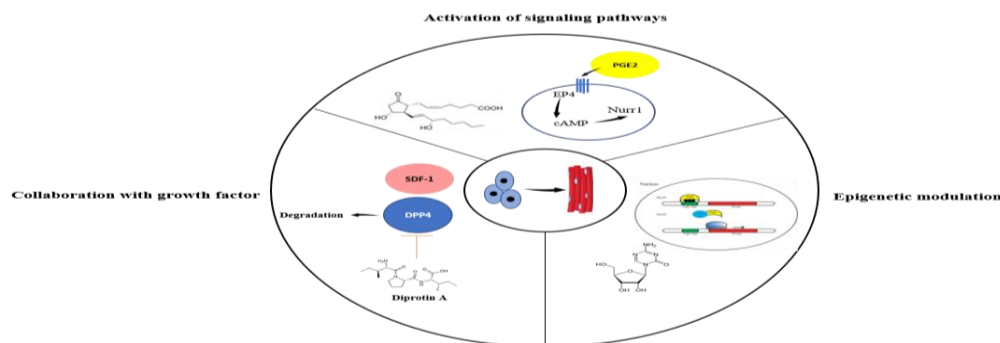
(۴۰)



القاء گر میوزنر است.

Apicidin (API)

- (۴۳)  عملکرد متابولیک و میتوکندریایی را افزایش داده و بازسازی عضلات در موش‌های پیر را سرعت می‌بخشد. mononucleotide (NMN)
- (۴۳)  عملکرد متابولیک و میتوکندریایی را افزایش داده و بازسازی عضلات در موش‌های پیر را سرعت می‌بخشد. nicotinamide riboside (NR)
- (۷)  تراکم مویرگی را تا ۶ برابر افزایش می‌دهد. CEP03
- (۳۸)  مهارکننده تیروزین فسفاتاز است که از تمایز جلوگیری کرده و باعث القای تکثیر در بافت عضلانی می‌شود. BpV
- (۴۴)  باعث افزایش تکثیر سلول‌های اقماری می‌شود. 2,4-diaminopyrimidine
- (۴۵)  همراه با FGF2 و BIO باعث تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSC) به عضله اسکلتی می‌شود. Forskolin
- (۴۴)  القاءگر تکثیر سلول‌های بنیادی عضله است. GSK2226649A
- (۳۴)  نشانه‌های بیماری‌های آتروفی عضلانی نخاعی و اسکروز جانبی آمیوتروفیک را بهبود می‌بخشد. Tirasemtiv
- (۴۶)  باعث القای مزودرم در طول میوزنز می‌شود. CHIR99021
- (۴۷)  ترمیم ماهیچه در بیماران مبتلا به دیستروفی را بهبود می‌بخشد. Givinostat
- (۴۷)  ترمیم ماهیچه در بیماران مبتلا به دیستروفی را بهبود می‌بخشد. HT-100/halofuginone



شکل ۲: مکانیسم‌های عمل کوچک مولکول‌ها

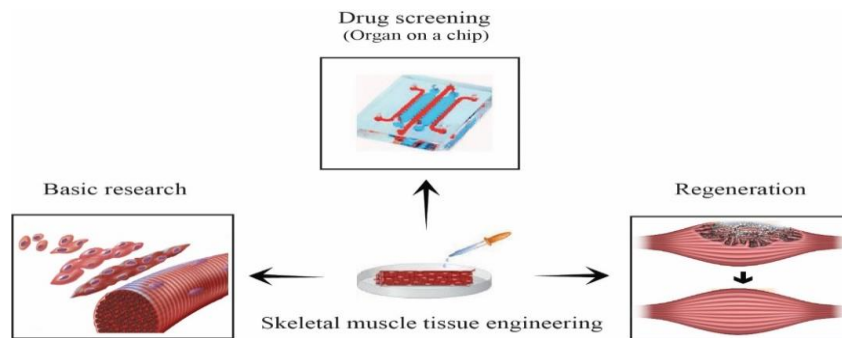
مختلفی در میوزن نقش دارند، لذا استفاده همزمان چند کوچک مولکول، یا استفاده و رهایش مرحله‌ای آن‌ها یک استراتژی برای افزایش بازده مهندسی بافت عضله خواهد بود. بافت عضله‌ای که به واسطه مهندسی بافت ساخته شده می‌تواند کاربردهای بالقوه وسیعی داشته باشد (شکل ۳). استفاده درمانی این بافت‌ها از مهم‌ترین کاربردهای مهندسی بافت عضله است. هرچند مهندسی بافت عضله در ابتدای مسیر است ولی تولید بافت عضله در اندازه‌ها و اشکال متناسب بافت آسیب دیده و پیوند آن‌ها و یا تولید عضله در شرایط درون‌تنی می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد درمانی ایجاد گردد. هم‌چنین مهندسی بافت عضله می‌تواند به‌عنوان یک مدل تکوینی در مطالعات بنیادی و پایه استفاده شده و به‌عنوان بستری برای بررسی میوزن و نیز فاکتورهای دخیل در تمایز، بلوغ، مهاجرت و عملکرد سلول‌های عضلانی عمل کند. علاوه بر این، برای غربالگری دارو و بررسی سمیت نیز می‌توان از بافت عضله مهندسی شده استفاده کرد. با وجود تفاوت‌های بین گونه‌ای در فیزیولوژی، عملکرد و ساختار سلول‌ها و بافت‌های بدن حیوانات مدل با انسان، به نظر می‌رسد که بافت عضله انسانی تولید شده در شرایط برون‌تنی می‌تواند یک مدل مناسب برای غربالگری دارو و بررسی سمیت باشد. هم‌چنین این رویکرد برای بررسی و طراحی داروهای فرد محور نیز بسیار مناسب خواهد بود.

حامی مالی: دانشگاه شهید بهشتی و پژوهشگاه رویان

تعارض در منافع: وجود ندارد.

نتیجه‌گیری

مهندسی بافت عضله یک رویکرد امیدوارکننده برای تولید بافت عضلانی مورد نیاز در درمان بافت عضلانی آسیب دیده است. با توجه به شیوع بالای بیماری‌ها و عوامل ایجادکننده نقص عضلانی، و نیز پایین بودن بازده روش‌های درمانی دیگر، اهمیت مهندسی بافت عضله بیش از پیش مشخص می‌شود. اما مهندسی بافت عضله اسکلتی هنوز در مراحل ابتدایی است. فاکتورهای فیزیکی/القایی یکی از فاکتورهای اصلی مهندسی بافت هستند و جایگزین کردن آن‌ها با کوچک مولکول‌ها و یا استفاده همزمان کوچک مولکول‌ها با سایر فاکتورهای فیزیکی/القایی می‌تواند بازده بافت عضله تولید شده را بهبود ببخشد و هزینه را کاهش دهد. هم‌چنین با توجه به اینکه کوچک مولکول‌ها معمولاً پاسخ ایمنی ایجاد نمی‌کنند، در نتیجه راه برای استفاده از بافت عضله مهندسی شده در درمان هموارتر می‌شود. در آینده ممکن است با پژوهش‌های بیشتر، دوز مورد نیاز کوچک مولکول‌ها، طول عمر و نحوه انتقال به بافت آسیب دیده بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد و در نتیجه منجر به افزایش کارایی بافت مهندسی شده بشود. امروزه مطالعات زیادی در زمینه پیدا کردن کوچک مولکول‌های موثر در میوزن و مهندسی بافت عضله در حال انجام است. هم‌چنین نحوه رهایش این کوچک مولکول‌ها و زمان‌بندی تاثیر آن‌ها می‌تواند باعث بهبود کیفیت بافت عضله تولید شده در شرایط درون‌تنی یا برون‌تنی باشد. از طرفی با توجه به اینکه مسیرهای



شکل ۳: کاربردهای بالقوه مهندسی بافت عضله اسکلتی

References:

- 1-Gilbert-Honick J, Ginn B, Zhang Y, Salehi S, Wagner K, Mao H-Q, et al. *Adipose-Derived Stem/Stromal Cells on Electrospun Fibrin Microfiber Bundles Enable Moderate Muscle Reconstruction in a Volumetric Muscle Loss Model*. Cell Transplant 2018; 27(11): 1644-56.
- 2-Mercuri E, Muntoni F. *Muscular Dystrophies*. Lancet 2013; 381(9869): 845-60.
- 3- Bonne G, Quijano-Roy S. *Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, Laminopathies, and other Nuclear Envelopathies*. Handb Clin Neurol 2013; 113: 1367-76.
- 4-Suominen T, Bachinski LI, Auvinen S, Hackman P, Baggerly Ka, Angelini C, et al. *Population Frequency of Myotonic Dystrophy: Higher than Expected Frequency of Myotonic Dystrophy Type 2 (Dm2) Mutation in Finland*. Eur J Hum Genet 2011; 19(7): 776-82.
- 5-André Lm, Ausems Crm, Wansink Dg, Wieringa B. *Abnormalities in Skeletal Muscle Myogenesis, Growth, and Regeneration in Myotonic Dystrophy*. Front Neurol 2018; 9: 1-24.
- 6-Lacruz G, Rouleau Aj, Couture V, Sollrard T, Drouin G, Veillette N, et al. *Increased Stiffness in Aged Skeletal Muscle Impairs Muscle Progenitor Cell Proliferative Activity*. Plos One 2015; 10(8): E0136217.
- 7-Nakayama KH, Shayan M, Huang NF. *Engineering Biomimetic Materials for Skeletal Muscle Repair and Regeneration*. Advanced Healthcare Materials 2019; 8(5): 1801168.
- 8-Kwee B, Mooney D. *Biomaterials for Skeletal Muscle Tissue Engineering*. Current Opinion in Biotechnology 2017; 47: 16-22.
- 9-Qazi Th, Duda Gn, Ort Mj, Perka C, Geissler S, Winkler T. *Cell Therapy to Improve Regeneration of Skeletal Muscle Injuries*. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2019; 10(3): 501-16.
- 10- Liu J, Saul D, Böker K, Ernst J, Lehmann W, Schilling AF. *Current Methods for Skeletal Muscle*

- Tissue Repair and Regeneration*. Biomed Research International 2018; 2018.
- 11-Nakamura Y, Miyaki S, Ishitobi H, Matsuyama S, Nakasa T, Kamei N, et al. *Mesenchymal-Stem-Cell-Derived Exosomes Accelerate Skeletal Muscle Regeneration*. Febs Lett 2015; 589(11): 1257-65.
- 12-Grasman Jm, Zayas Mj, Page Rl, Pins Gd. *Biomimetic Scaffolds for Regeneration of Volumetric Muscle Loss in Skeletal Muscle Injuries*. Journals & Books 2015; 25: 2-15.
- 13-Beldjilali-Labro M, Garcia Garcia A, Farhat Fa-O, Bedoui F, Grosset Jf, Dufresne M, et al. *Biomaterials in Tendon and Skeletal Muscle Tissue Engineering: Current Trends and Challenges*. Materials 2018; 11(7): 1116.
- 14-Urciuolo A, Urbani La-Ox, Perin Sa-O, Maghsoudlou P, Scottoni Fa-O, Gjinovci A, et al. *Decellularised Skeletal Muscles Allow Functional Muscle Regeneration by Promoting Host Cell Migration*. Scientific Reports 2018; 8: 1-20.
- 15-Qazi T, Mooney D, Pumberger M, Geissler S, Duda G. *Biomaterials Based Strategies for Skeletal Muscle Tissue Engineering: Existing Technologies and Future Trends*. Biomaterials 2015;53: 502-21.
- 16-Pantelic Mn, Larkin Lm. *Stem Cells for Skeletal Muscle Tissue Engineering*. Tissue Eng Part B Rev 2018; 24(5): 373-91.
- 17-Agrawal G, Aung A Fau -Varghese S, Varghese S. *Skeletal Muscle-On-A-Chip: An in Vitro Model to Evaluate Tissue Formation and Injury*. Lab on a Chip 2017; 17(20): 3447-61.
- 18-Qazi Th, Mooney Dj, Pumberger M, Geissler S, Duda Gn. *Biomaterials Based Strategies for Skeletal Muscle Tissue Engineering: Existing Technologies and Future Trends*. Biomaterials 2015; 53: 502-21.
- 19-Allur Subramaniyan S, Sheet S, Balasubramaniam S, Berwin Singh Sv, Rampa Dr, Shanmugam S, et al. *Fabrication of Nanofiber Coated with L-Arginine via Electrospinning Technique: A Novel Nanomatrix to Counter Oxidative Stress under Crosstalk of Co-Cultured Fibroblasts and Satellite Cells*. Cell Communication & Adhesion 2018; 24(1): 19-32.
- 20-Narayanan N, Jiang C, Uzunalli G, Thankappan Sk, Laurencin Ct, Deng M. *Polymeric Electrospinning for Musculoskeletal Regenerative Engineering*. Regenerative Engineering and Translational Medicine 2016; 2(2): 69-84.
- 21-Chal J, Pourquoi Oa-O. *Making Muscle: Skeletal Myogenesis in Vivo and in Vitro*. Development 2017; 144: 2104-22.
- 22-Vandusen Kw, Syverud Bc, Williams Ml, Lee Jd, Larkin Lm. *Engineered Skeletal Muscle Units for Repair of Volumetric Muscle Loss in the Tibialis Anterior Muscle of a Rat*. Tissue Eng Part A 2014; 20(21-22): 2920-30.
- 23-Pantelic Mn, Larkin Lm. *Stem Cells for Skeletal Muscle Tissue Engineering*. Tissue Engineering Part B: Reviews 2018; 24(5): 373-91.
- 24-Di Filippo Es, Mancinelli R, Marrone M, Doria C, Verratti V, Toniolo L, et al. *Neuromuscular Electrical Stimulation Improves Skeletal Muscle Regeneration through Satellite Cell Fusion with Myofibers in Healthy Elderly Subjects*. J Appl Physiol 2017; 123(3): 501-12.

- 25-Syverud Bc, Vandusen Kw, Larkin Lm. *Growth Factors for Skeletal Muscle Tissue Engineering*. Cells Tissues Organs 2015; 202: 169-79.
- 26-Rajabi S, Jalili-Firoozinezhad Sa-Ox, Ashtiani Mk, Le Carrou G, Tajbakhsh S, Baharvand H. *Effect of Chemical Immobilization of Sdf-1alpha into Muscle-Derived Scaffolds on Angiogenesis and Muscle Progenitor Recruitment*. J Tissue Eng Regen Med 2018; 12(1): e438-e450.
- 27-Fernández-Pérez J, Ahearne M. *The Impact of Decellularization Methods on Extracellular Matrix Derived Hydrogels*. Scientific Reports 2019; 9(1): 14933.
- 28-Borselli C, Ungaro F, Oliviero O, D'angelo I, Quaglia F, La Rotonda Mi, et al. *Bioactivation of Collagen Matrices through Sustained Vegf Release from Plga Microspheres*. J Biomed Mater Res A 2010; 92(1): 94-102.
- 29-Aravamudhan A, Ramos D, Nip J, Subramanian A, James R, Harmon M, et al. *Osteoinductive Small Molecules: Growth Factor Alternatives for Bone Tissue Engineering*. Current Pharmaceutical Design 2013;19: 3420-28.
- 30-Gey C, Giannis A. *Small Molecules, Big Plans--Can Low-Molecular-Weight Compounds Control Human Regeneration?* Angew Chem Int Ed Engl 2004; 43(31): 3998-4000.
- 31-Lo Kw, Jiang T, Gagnon Ka, Nelson C, Laurencin Ct. *Small-Molecule Based Musculoskeletal Regenerative Engineering*. Trends Biotechnol 2014; 32(2): 74-81.
- 32-Ho A, Palla A, Blake M, Yucel N, Wang Yx, Magnusson K, et al. *Prostaglandin E2 is Essential for Efficacious Skeletal Muscle Stem-Cell Function, Augmenting Regeneration & Strength*. Proc Natl Acad Sci USA 2017; 114(26): 6675-84.
- 33-Kim W-H, Jung D-W, Kim J, Im S-H, Hwang S, Williams D. *Small Molecules that Recapitulate the Early Steps of Urodele Amphibian Limb Regeneration and Confer Multipotency*. ACS Chem Biol 2012; 7(4): 732-43.
- 34-Collibee S, Bergnes G, Muci A, Browne W, Hinken A, Russell A, et al. *Discovery of Tirasemtiv, the First Direct Fast Skeletal Muscle Troponin Activator*. ACS Med Chem Lett 2018; 9(4): 354-58.
- 35-Ding Z, Zhou M, Zhou Z, Zhang W, Jiang X, Lu X, et al. *Injectable Silk Nanofiber Hydrogels for Sustained Release of Small-Molecule Drugs and Vascularization*. ACS Biomater Sci Engineering 2019; 5(8): 4077-88.
- 36-Ieronimakis N, Pantoja M, Hays A, Dosey T, Qi J, Fischer K, et al. *Increased Sphingosine-1-Phosphate Improves Muscle Regeneration in Acutely Injured Mdx Mice*. Skeletal Muscle 2013; 3(20): 1-21.
- 37-Syverud B, Vandusen K, Larkin L. *Effects of Dexamethasone on Satellite Cells and Tissue Engineered Skeletal Muscle Units*. Tissue Eng Part A 2016; 22(5-6): 480-89.
- 38-Um J, Jung D-W, Williams Dr. *Lessons from the Swamp: Developing Small Molecules that Confer Salamander Muscle Cellularization in Mammals*. Clinical and Translational Medicine 2017; 6(1): 1-7.
- 39-Adams Cm, Ebert Sm, Dyle Mc. *Use of Mrna Expression Signatures to Discover Small Molecule Inhibitors of Skeletal Muscle Atrophy*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2015; 18(3): 263-8.

- 40-Ikeda K, Ito A, Imada R, Sato M, Kawabe Y, Kamihira M. *In Vitro Drug Testing Based on Contractile Activity of C2c12 Cells in an Epigenetic Drug Model*. Scientific Reports 2017; 7: 44570.
- 41-Fasolino I, Guarino V, Cirillo V, Ambrosio L. *5- Azacytidine- Mediated Hmsc Behavior on Electrospun Scaffolds for Skeletal Muscle Regeneration*. J Biomed Materials Res Part A 2017; 105(9): 2551-61.
- 42-Goonoo N, Bhaw-Luximon A. *Mimicking Growth Factors: Role of Small Molecule Scaffold Additives in Promoting Tissue Regeneration and Repair*. RSC Advances 2019; 9(32): 18124-46.
- 43-Neelakantan H, Brightwell C, Graber T, Maroto R, Wang HY, Mchardy S, et al. *Small Molecule Nicotinamide N-Methyltransferase Inhibitor Activates Senescent Muscle Stem Cells and Improves Regenerative Capacity of Aged Skeletal Muscle*. Biochemical Pharmacology 2019; 163: 481-92.
- 44-Billin An, Bantscheff M, Drewes G, Ghidelli-Disse S, Holt Ja, Kramer Hf, et al. *Discovery of Novel Small Molecules that Activate Satellite Cell Proliferation and Enhance Repair of Damaged Muscle*. ACS Chemical Biology 2016; 11(2): 518-29.
- 45-Xu C, Tabebordbar M, Iovino S, Ciarlo C, Liu J, Castiglioni A, et al. *A Zebrafish Embryo Culture System Defines Factors that Promote Vertebrate Myogenesis Across Species*. Cell 2013; 155(4): 909-21.
- 46-Abujarour R, Bennett M, Valamehr B, Lee T, Robinson M, Robbins D, et al. *Myogenic Differentiation of Muscular Dystrophy-Specific Induced Pluripotent Stem Cells for Use in Drug Discovery*. Stem Cells Translational Medicine 2014; 3(2): 149-60.
- 47-Lu B, Atala A. *Small Molecules and Small Molecule Drugs in Regenerative Medicine*. Drug Discovery Today 2013; 19(6): 801-8.
- 48-Borchin B, Chen J, Barberi T. *Derivation and Facs-Mediated Purification of Pax3+/Pax7+ Skeletal Muscle Precursors from Human Pluripotent Stem Cells*. Stem Cell Reports 2013; 1(6): 620-31.
- 49-Ou X, O'leary HA, Broxmeyer HE. *Implications of Dpp4 Modification of Proteins that Regulate Stem/Progenitor and More Mature Cell Types*. Blood 2013; 122(2): 161-9.
- 50-Montesano A, Luzi L, Senesi P, Terruzzi I. *Modulation of Cell Cycle Progression by 5-Azacytidine is Associated with Early Myogenesis Induction in Murine Myoblasts*. International J Biological Sci 2013;9(4): 391-402.
- 51-Zhang D, Yan K, Zhou J, Xu T, Xu M, Lin J, et al. *Myogenic Differentiation of Human Amniotic Mesenchymal Cells and its Tissue Repair Capacity on Volumetric Muscle Loss*. J Tissue Eng 2019; 10: 2041731419887100.

Applications of Small Molecules in Muscle Tissue Engineering

Behnaz Mirza Ahmadi¹, Mahmood Talkhabi^{*1}, Sarah Rajabi^{†2}

Review Article

Introduction: Skeletal muscles account for about 40% of the total body weight. Every year, hundreds of people lose at least part of their muscle tissue due to illness, war, and accidents. This can lead to disruption of activities such as breathing, movement, and social life. To this end, various therapeutic strategies such as medication therapy, cell therapy and tissue transplantation have been used or studied in muscle regeneration. However, there is no effective and well-defined clinical approach for treatment of muscle injuries and the severity of muscle injuries increase with age in most cases. Therefore, investigation for finding new and effective clinical approach for muscle regeneration is one of the most important issues in basic and clinical researches. Tissue engineering is considered as one of the promising and newest approach for skeletal muscle tissue regeneration and provides an appropriate model for personalized medicine and basic researches that can be used in personalized medicine and basic research. Besides biomaterials and cells, inducing factors are another element of tissue engineering. These factors influence epigenetic mechanisms and signaling pathway, thereby inducing proliferation, differentiation, and migration of cells used in muscle tissue engineering, and accelerates muscle formation *in vitro*. Recently, small molecules have been used as alternatives to growth factors or along with other inducing factors in muscle tissue engineering. Since they do not induce an immune reaction, penetrate easily to the cells and have a specific molecular target, therefore they have attracted much attention as the cost-effective inducing factors in tissue engineering.

Conclusion: Taken together, the effective small molecules in muscle tissue engineering can be used with different biomaterial conditions (e.g. hydrogel, decellularized tissue, and synthetic scaffolds) in both *in vivo* and *in vitro*, resulting to production of cost effective and highly efficient engineered muscle tissues that help to achieve therapeutical goals of muscle tissue engineering. Herein, we describe tissue engineering and review the small molecules used in skeletal muscle tissue engineering.

Keywords: Regenerative medicine, Skeletal muscle Tissue engineering, Small molecules, Epigenetic, Signaling pathway.

Citation: Mirza Ahmadi B, Talkhabi M, Rajabi S. **Applications of Small Molecules in Muscle Tissue Engineering.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2021; 28(11): 3164-77

¹Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

²Department of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09195571785, email: m_talkhabi@sbu.ac.ir and srajabi@royaninstitute.org