Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 30, No. 4, Winter 2020 REVIEW ARTICLE

# Beta thalassemia gene therapy using lentiviral vectors

***Mohammad Ali Khosravi[1], Maryam Abbasalipour[1], Sirous Zeinali[2], Morteza Karimipoor[3]***
*[1] PhD of Medical Biotechnology, Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute of Tehran, Tehran, Iran*
*[2]Professor, Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Tehran, Iran*
*[3]Associate Professor, Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Tehran, Iran*

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11 ]

[ DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.1.8 ]
[ DOI: 10.29252/iau.30.4.341 ]

## Abstract

Recent years, allogeneic bone marrow transplantation (BMT) has proved to be the successful cure for patients with thalassemia major, however this is restricted due to limited matched-related donor. Its complications include chronic graft-versus-host disease in 5-8% of patients. So, a molecular approach, such as gene therapy for direct normal beta globin gene transmission, seems quite promising to cure thalassemia. The goal of beta thalassemia gene therapy is to restore normal RBC production capacity in patients by suitable vector and correct inherited anemia. Virus therapy has recently been recognized as a promising new therapeutic approach in medical research. In this regard, the use of viruses as non-replicating gene therapy vectors or as replication viruses (oncolytic viruses) has provided attractive opportunities for viral therapy applications. Currently viral vectors have been used in nearly 70% of the clinical trials. In recent years, many researchers have designed erythroid-specific lentiviral vectors carrying the beta-globin gene that have obtained significant results. Their findings are presented in this study.

**Keywords**: *Beta- thalassemia, Gene therapy, Lentiviral vector.*

**Cited as:** Khosravi MA, Abbasalipour M, Zeinali S, Karimipoor M. Beta thalassemia gene therapy using lentiviral vectors. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2020; 30(4): **341-351.**

**Correspondence to:** Morteza Karimipoor
***Tel:*** *+98 02166402751*
***E-mail:*** mortezakarimi@yahoo.com
**ORCID ID:** 0000-0002-2406-5963
**Received:** 1 Sep 2019; **Accepted:** 27 Jun 2020

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۰، شماره ۴، زمستان ۹۹، صفحات ۳۴۱ تا ۳۵۱

Review Article

# ژن درمانی بتاتالاسمی توسط وکتورهای لنتی ویروسی

**محمدعلی خسروی[۱]، مریم عباسعلی پور[۱]، سیروس زینلی[۲]، مرتضی کریمی پور[۳]**

[۱] دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، گروه پزشکی مولکولی، انستیتوپاستور تهران، ایران
[۲]استاد، گروه پزشکی مولکولی، انستیتوپاستور تهران، ایران
[۳]دانشیار، گروه پزشکی مولکولی، انستیتوپاستور تهران، ایران

## چکیده

*درحال حاضر تنها درمان موثر بیماری بتاتالاسمی، پیوند مغزاستخوان آلوژنیک در افراد بیمار است. بزرگ‌ترین محدودیت انجام این روش کمبود دهنده پیوند با آنتی ژن سازگار بافتی مشابه در اکثر موارد است. از عوارض شایع آن می‌توان به بیماری مزمن پیوند علیه میزبان در ۸-۵٪ از بیماران اشاره داشت. در روش درمانی متداول برای درمان بیماری‌های ارثی، انتقال یک یا چند ژن برای جبران عملکرد ژن معیوب به کار می‌رود. بنابراین کلید اصلی در ژن درمانی موفق در استفاده از تکنیک انتقال مناسب ژن به سلول‌های هدف در بافت های انسانی است؛ در نتیجه هدف ژن درمانی در درمان بیمار بتاتالاسمی بازگرداندن توانایی و ظرفیت تولید گلبول قرمز حاوی هموگلوبین نرمال و سالم در افراد بیماری است که تولید اریتروسیت ناکارآمد را کاهش داده و بیماری کم خونی ارثی را درمان می‌کند. امروزه استفاده از ویروس‌ها به عنوان ابزار درمانی وارد مرحله جدیدی شده است. در این راستا استفاده از ویروس‌ها، به صورت ویروس‌های غیرهمانند سازی کننده به عنوان وکتورهای ژن درمانی و یا به صورت ویروس‌های همانندسازی کننده (ویروس‌های انکولیتیک)، زمینه جالب توجهی تحت عنوان ویروس درمانی را به وجود آورده است. در حال حاضر، تقریبا ۷۰٪ کارآزمایی‌های بالینی ژن‌درمانی از وکتورهای ویروسی استفاده کرده‌اند. در چند سال اخیر محققان زیادی، وکتورهای لنتی ویروسی مختص رده اریتروئیدی، حامل ژن بتاگلوبین طراحی کرده‌اند که نتایج درمانی رضایت‌بخشی از تزریق سلول‌های بنیادی خون‌ساز به صورت in vitro و exvivo به دست آورده اند که در این مطالعه نتایج این تحقیقات ارائه می‌شود.*

***واژگان کلیدی:*** *بتاتالاسمی، ژن درمانی، وکتورهای لنتی ویروسی.*

## مقدمه

بتا تالاسمی یکی از بیماری‌های ارثی خونی است که بیش از ۳۰۰ موتاسیون در ژن بتا گلوبین در ایجاد آن دخیل است (۱). بتا تالاسمی به علت کاهش یا فقدان سنتز زنجیره‌های بتاگلوبین ایجاد می‌شود. در این بیماری، تولید ناکافی مولکول‌های بتاگلوبین منجر به بالا رفتن میزان زنجیره‌های آلفا گلوبین جفت نشده می‌شود. این زنجیره‌ها در پیش سازهای اریتروئید رسوب کرده و این رسوبات بلوغ پیش سازهای اریتروئیدی را مختل می‌کنند و منجر به آسیب غشا سلولی می‌شوند؛ بنابراین به مرگ این سلول‌ها می‌انجامد و این به نوبه خود گلبول‌های قرمز ناکارآمد تولید می‌کند. تولید گلبول‌های قرمز ناکارآمد منجر به مشکلات ثانویه‌ای در استخوان‌ها و دیگر اعضای بدن می‌شود. در واقع شدت و بروز علائم بالینی این بیماری به میزان عدم تعادل بین زنجیره های آلفا و بتا بستگی دارد (۲).

از بین ۲۷۰ میلیون نفر که ناقل اختلالات هموگلوبین هستند، ۸۰ میلیون آنها ناقلین بیماری بتا تالاسمی هستند (۳, ۴). در کل برآورد شده که حدود ۴/۵٪ از جمعیت جهان حامل موتاسیون‌های بتا تالاسمی هستند (۵) و بیشترین شیوع آن در منطقه مدیترانه، آسیای مرکزی، خاورمیانه و شبه قاره هند است. علت شیوع بیماری‌های اختلال هموگلوبین نسبت به

**آدرس نویسنده مسئول:** تهران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه پزشکی مولکولی، انستیتوپاستور تهران، مرتضی کریمی پور (**email**: mortezakarimi@yahoo.com)
**ORCID ID:** 0000-0002-2406-5963
**تاریخ دریافت مقاله:** ۹۸/۶/۱۰
**تاریخ پذیرش مقاله:** ۹۸/۱۱/۷

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11 ]
[ DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.1.8 ]
[ DOI: 10.29252/iau.30.4.341 ]

سایر بیماری‌های مونوژنیک به دلیل انتخاب طبیعی ناشی از مقاومت نسبی ناقلین این بیماری‌ها به مالاریا (پلاسمودیوم فالسیپاروم) و درصد بالای ازدواج‌های فامیلی است (۴، ۸-۶). در منطقه مدیترانه شرقی، ایران با جمعیتی بیش از ۲۳ هزار بیمار بتاتالاسمی یکی از مراکز شایع این بیماری است (۹).

## روش‌های درمان

### تزریق خون

یکی از درمان‌های اصلی برای بیماران کم خونی بتا تالاسمی، تزریق خون هر ۲ تا ۵ هفته است. سطح هموگلوبین بین ۹ تا۱۰ g/dl برای ممانعت از خون‌سازی توسط سلول‌های خون‌ساز بیمار و رشد و نمو طبیعی بیمار کافی است. افزایش سطح هموگلوبین به بالاتر از این حد منجر به بالا رفتن بیش از حد آهن در خون می‌شود که یکی از بزرگ‌ترین مشکلات درمان از طریق انتقال خون است (۴, ۱۰, ۱۱).

### شلاسیون

از این ترکیبات برای حذف آهن حاصل از تزریق مکرر خون در بیماران تالاسمی استفاده می‌شود. یکی از شلاتورهای رایج دسفریوکسامین است که قابلیت زیادی در درمان تالاسمی، از بین بردن سمیت خون و افزایش طول عمر بیمار دارد (۱۱، ۱۲).

### پیوند مغز استخوان

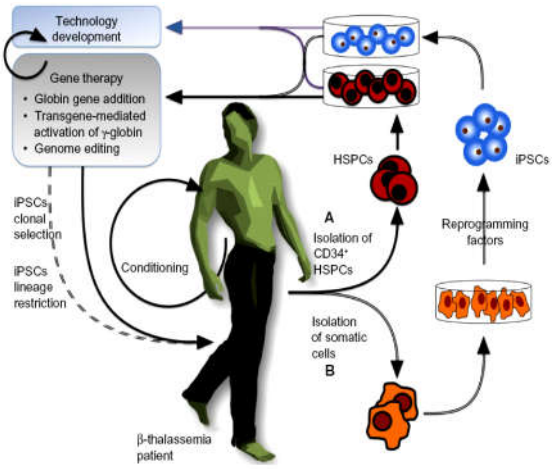
در حال حاضر بهترین و امیدوارکننده‌ترین روش درمان، پیوند مغز استخوان است، اما موانع موجود در این مسیر، شامل تهاجمی بودن آن، تطبیق آنتی ژن سازگار بافتی بین گیرنده و دهنده پیوند و نیاز به استفاده طولانی مدت از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی (Immunosuppressive Drug) برای جلوگیری یا درمان بیماری پیوند علیه میزبان ( Graft versus host disease)، استفاده از این روش درمانی را محدود کرده است (۱۱).

### القاء هموگلوبین جنینی

شواهدی طبیعی دال بر همبستگی بین کاهش علایم بیماری و سطح بالای HbF وجود دارد. کودکان مبتلا به بیماری کم خونی داسی در ابتدای تولد علایمی از بیماری نشان نمی‌دهند و علت آن بالا بودن هموگلوبین جنینی در بدو تولد است (۱۳). از طرف دیگر جمعیت‌های خاصی در عربستان سعودی و هند با بیماری کم خونی داسی هستند که شدت کم علایم بالینی دارند که پس از بررسی به سطح بالای HbF در آنها پی بردند (۱۴, ۱۵). مشاهدات مشابهی در بیماران با بتا تالاسمی دیده شده است. تحقیقات بسیاری نشان داده است که بالا رفتن تولید هموگلوبین جنینی (HbF) به دلیل ایجاد توازن بین زنجیره آلفا و غیر آلفا و جلوگیری از رسوب زنجیره آلفا، قادر به بهبود قابل توجهی در شدت این بیماری‌ها و بروز فنوتیپ ملایم‌تر از بیماری می‌شود (۱۶).

### ژن درمانی

ژن درمانی تکنیکی است که با استفاده از ابزارهای مهندسی ژنتیک، ژنوم فرد بیمار به منظور درمان دستخوش دستکاری قرار می‌گیرد. در ژن درمانی ممکن است سه حالت رخ دهد: ژن معیوب با ژن سالم جایگزین گردد، ژن معیوب خاموش گردد و یا اینکه به منظور درمان، ژن جدیدی به بدن فرد وارد شود. دیدگاه کلی در ژن درمانی بتا تالاسمی به این صورت است که سلول‌های بنیادی خونساز با مارکر سطحی CD34 به طور مستقیم به روش ژن درمانی تصحیح می‌شوند. روش دیگر اینکه سلول‌های سوماتیک جدا می‌شوند و به حالت چند توانه دوباره برنامه‌ریزی reprogrammed می‌شوند. ژن درمانی روی سلول‌های iPS تولید شده انجام و دوباره به دودمان اختصاصی متمایز می‌شود. در هر دو حالت سلول‌ها به بدن بیمار برگردانده می‌شوند (شکل ۱).




**شکل ۱.** دیدگاه کلی در ژن درمانی بتا تالاسمی. سلول‌های بنیادی و پیش ساز (HSPCs) یا سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده (iPSCs) می‌توانند هدف روش‌های ژن درمانی باشند (A). معمولا از سلول‌های CD34+ فرد بیمار جهت ژن‌درمانی استفاده می‌شود. این سلول‌ها به طور مستقیم دستخوش دستکاری ژنتیکی قرار گرفته و به بدن فرد برگردانده می‌شوند (B).

ممکن است از سلول‌های سوماتیک بدن فرد بیمار استفاده شود و در ابتدا reprogramming در مورد این سلول‌ها صورت

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11 ]
[ DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.1.8 ]
[ DOI: 10.29252/iau.30.4.341 ]

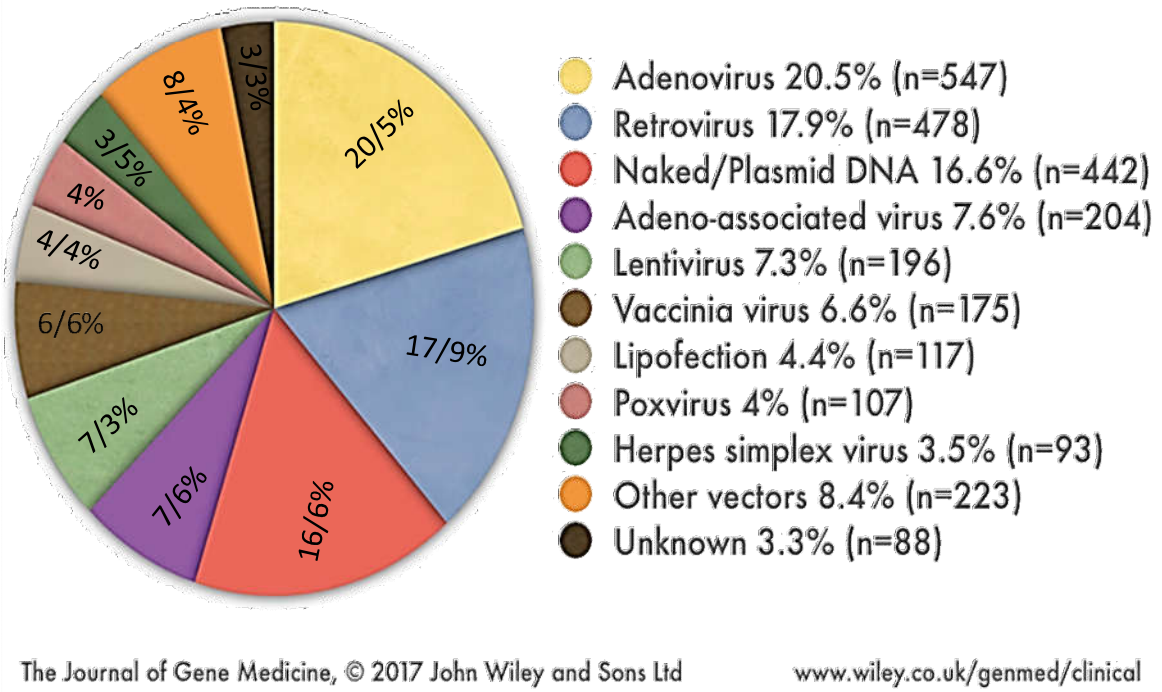
می‌گیرد و iPSCs حاصل شده برای ژن درمانی بیماران مورد استفاده قرار می‌گیرد.

کاربرد iPSCs جهت درمان بیماران هنوز در حال بررسی است که با نقطه چین مشخص شده است (۱۷).

وکتورهای مختلفی (ویروسی و غیرویروسی) در ژن‌درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این وکتورها جهت رساندن ژن‌های درمانی باید واجد معیارهای معینی از جمله تولید و تجویز آسان، قابلیت رساندن ژن به سلول‌های مورد نظر، میزان بیان مناسب و غیر سمی بودن برای سلول‌های سالم و فرد گیرنده، باشند (۱۸, ۱۹). بهترین وکتورهای ژن‌درمانی از نظر داشتن ترکیب مشخص و تکرارپذیری تولید و هزینه‌های مرتبط، ذرات سنتتیک هستند که می‌توان به لیپوزوم‌ها یا پلیمرها اشاره کرد. با این وجود، این روش‌ها هنوز کارآیی بالایی در ورود به سلول‌ها و بیان مداوم ژن درشرایط in vivo را ندارند (۲۰)؛ در مقابل، ویروس‌ها به گونه‌ای تکامل یافته‌اند تا با کارآیی بالا سلول‌های هدف را آلوده کرده و ماده ژنتیکی خود را به سلول منتقل کنند (۲۱). امروزه استفاده ازویروس‌ها به عنوان ابزار درمانی وارد مرحله جدیدی شده است. در این راستا استفاده از ویروس‌ها، به صورت ویروس‌های غیرهمانند سازی‌کننده به عنوان وکتورهای ژن‌درمانی و یا به صورت ویروس‌های همانندسازی کننده (ویروس‌های انکولیتیک)، زمینه جالب توجهی تحت عنوان ویروس درمانی را به وجود آورده است (۲۲). در حال حاضر تقریبا ۷۰٪ کارآزمایی‌های بالینی ژن‌درمانی از وکتورهای ویروسی مانند وکتورهای آدنوویروسی، رتروویروسی، وکتورهای همراه آدنو (AAV)، واکسینیا و سایر پاکس‌ویروس‌ها، لنتی ویروسی و ویروس هرپس و سایر ویروس‌ها ، بهره برده‌اند (شکل۲) (۲۳). در این کارآزمایی‌ها، یا تزریق مستقیم وکتور ویروسی به بافت‌های هدف انجام می‌شود و یا سلول‌ها را در خارج از بدن با ویروس‌ها تغییر داده، سپس به دنبال تکثیر، سلول‌ها را به بدن تزریق می‌کنند (ex vivo) (۱۹, ۲۰).

انتخاب وکتور ویروسی به سلول هدف و نیاز به بیان موقت و یا طولانی مدت، روش تجویز و ایمنی‌زایی وکتور ویروسی بستگی دارد (۲۴). با این وجود، اغلب کارآزمایی‌های بالینی ژن‌درمانی که مزایای بالینی از خود نشان داده‌اند با استفاده از وکتورهای همراه آدنو (AAV) و یا وکتورهای لنتی ویروسی و اغلب به صورت ex vivo انجام شده‌اند (۲۵).

پیش بینی می‌شود که در ۲۵ سال آینده، بهبودهای زیادی در زمینه‌های مرتبط با ایمنی، کارایی و تولید وکتورهای ویروسی مورد استفاده در ژن‌درمانی صورت گیرد؛ به گونه‌ای که شاید حتی انتقال ژن به صورت یک روش مقرون به صرفه جهت رساندن داروهای زیستی به بدن تبدیل شود (۲۰).




**شکل ۲.** وکتورهای مورد استفاده در کارآزمایی‌های بالینی ژن‌درمانی. بیشترین تعداد مطالعات کارآزمایی بالینی مربوط به وکتورهای آدنوویروسی است (۲۰/۵ ٪) و وکتورهای لنتی ویروسی ۷/۳ ٪ مطالعات را به خود اختصاص داده‌اند (۲۳).

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11 ]
[ DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.1.8 ]
[ DOI: 10.29252/iau.30.4.341 ]

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11 ]

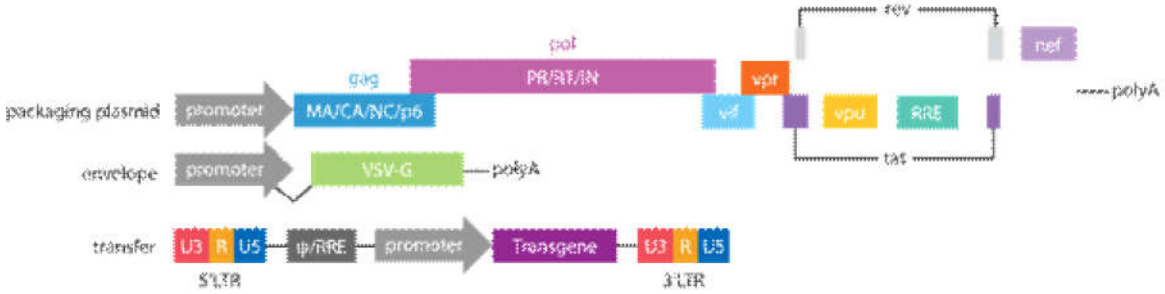
[ DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.1.8 ]

[ DOI: 10.29252/iau.30.4.341 ]

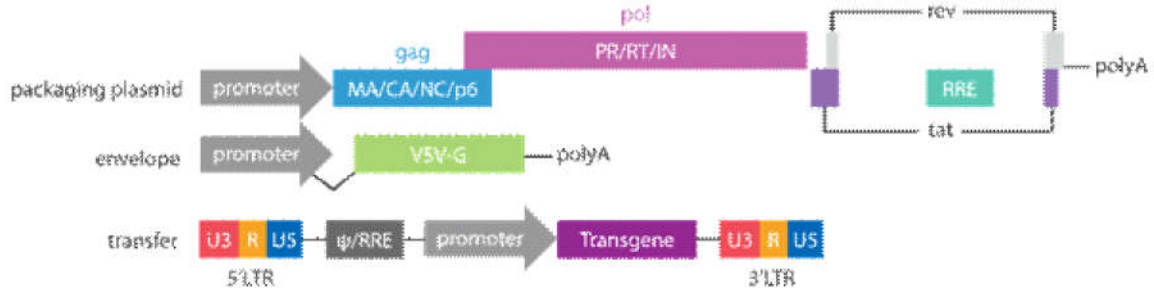
**تولید وکتورهای لنتی ویروسی**

وکتورهای لنتی ویروس از طریق ترانسفکشن رده سلولی کلیه جنین انسانیHEK293T به طور هم‌زمان توسط پلاسمیدهای بسته بندی، پلاسمید ترانسفر و پلاسمید کد کننده پوشش گلیکوپروتئینی ویروس تولید می‌شوند (۲۶). ژنوم ویروس، ژن-های ساختاری (pol،gag و env) ، ژن‌های تنظیمی (rev و tat) و ژن‌های کمکی (vif، vpr،vpu و nef) را کد می‌کند که این ژن‌ها به وسیله بازوهای LTR (Long Terminal Repeat) احاطه شده‌اند. پروتئین Gag به پروتئین‌های ماتریکس MA، کپسید CA، نوکلئوکپسید و p6 شکسته می‌شود. پروتئین-Pol Gag، سه آنزیم ضروری پروتئاز PR، نسخه بردار معکوس RT و اینتگراز IN را می‌سازد. در پلاسمید ترانسفر سیستم وکتورهای لنتی ویروسی فاقد قدرت تکثیر، تمامی ژن‌های اصلی و فرعی بین دو LTR با پروموتور و سازه ژنی مورد نظر جایگزین شده‌اند. به جزء توالی سیگنال بسته بندی، LTR و توالی‌های مورد نیاز جهت رونویسی معکوس و الحاق در ژنوم، سایر توالی‌ها در سیستم های لنتی ویروسی حذف شده است.

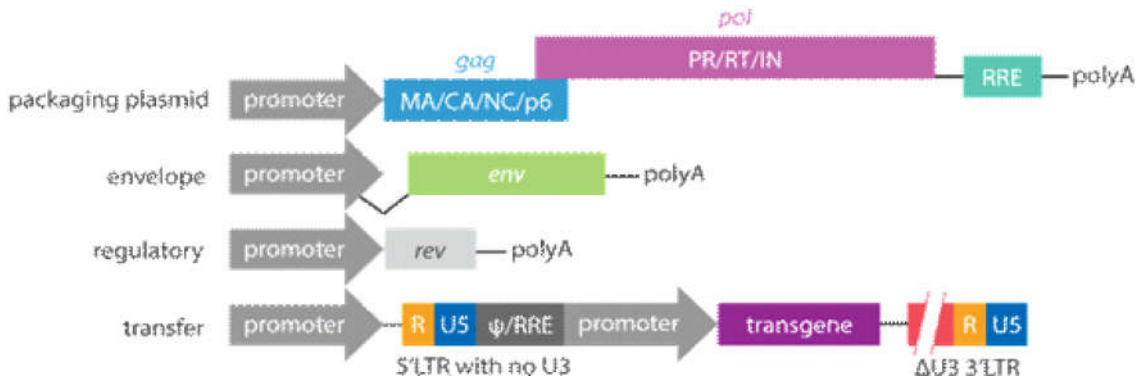
از نگرانی‌های اصلی که در مورد وکتورهای لنتی ویروسی وجود دارد، احتمال تولید ویروس دارای قدرت تکثیر توسط نوترکیبی با ویروس‌های وحشی درون سلول هدف است. این نگرانی منجر به تولید وکتورهای ترانسفر Self-Inactivating Vectors (SIN) شد. در این وکتورها نواحی پروموتوری و شتاب دهنده رونویسی از ناحیه U3' LTR حذف شده است. بنابراین هرگونه رونویسی توسط نواحی LTR ویروسی در این




**شکل ۳.** نسل اول وکتورهای لنتی ویروسی. در نسل اول ژن بیان کننده پروتئین انولوپ gp160 حذف شد (۲۷).




**شکل ۴.** نسل دوم وکتورهای لنتی ویروسی. در نسل دوم ژن‌های کدکننده پروتئین‌های کمکی vpr، vpu، vif و nef نیز حذف شدند (۲۷).




**شکل ۵.** نسل سوم وکتورهای لنتی ویروسی. در نسل سوم اجزای پلاسمید بسته‌بندی دردو پلاسمید مجزا قرار گرفتند که یکی Gag و Pol را کد می‌کند و پلاسمید دیگر Rev را کد می‌نماید و از سوی دیگر ژن tat نیزحذف شد (۲۷).

وکتورها حذف شده و بیان ژن مورد نظر فقط توسط پروموتور داخلی تنظیم می‌شود (۲۶).

وکتورهای لنتی ویروسی با توجه به پلاسمید بسته بندی مورد استفاده جهت تولید ذرات ویروسی به سه نسل طبقه بندی می‌شوند. در اولین نسل این وکتورها، پلاسمید بسته بندی حاوی ژن‌های کد کننده gag و pol مورد نیاز جهت ساخت و الحاق ژنوم ویروس در ژنوم میزبان، به علاوه ژن‌های تنظیم کننده ویروسی tat و rev و همچنین ژن‌های کمکی vif، vpr، vpu و nef است (شکل ۳) (۲۶).

در نسل دوم وکتورهای لنتی ویروسی ژن‌های ضروری جهت بیماری‌زایی (vif، vpr، vpu و nef) از پلاسمید بسته بندی حذف شدند؛ به این ترتیب با افزایش safety پلاسمید مذکور اختلالی در تولید ذرات لنتی ویروسی از لحاظ میزان تیتر ویروس و کارایی آلوده کردن انواع رده های سلولی وارد نشد (شکل ۴) (۲۶).

در نسل سوم وکتورهای لنتی ویروسی، safety سیستم بسته بندی توسط جدا کردن ژن rev و بیان آن توسط یک پلاسمید جداگانه افزایش یافت. همچنین ژن tat از وکتور بسته بندی حذف شد و به جای آن یک پروموتور داخلی در ناحیه 5'LTR پلاسمید ترانسفر جایگزین شد. به این ترتیب احتمال نوترکیبی و تولید نوع وحشی لنتی ویروس به دلیل شباهت بسیار کم وکتورها به طور قابل توجهی کاهش یافت (شکل ۵) (۲۶).

**ژن درمانی بتاتالاسمی با وکتورهای لنتی ویروسی**

کاربرد ژن درمانی بعد از توسعه وکتورهای ویروسی در سال ۱۹۸۰ به واقعیت تبدیل شد و در اولین کارآزمایی بالینی در سال ۱۹۹۰، با استفاده از رتروویروس، با موفقیت ژن را انتقال دادند. در نتیجه هدف ژن درمانی در درمان بیماری بتاتالاسمی بازگرداندن توانایی و ظرفیت تولید گلبول قرمزحاوی هموگلوبین نرمال و سالم در افراد بیمار است که تولید اریتروسیت ناکارآمد را کاهش داده و بیماری کم خونی ارثی را درمان می‌کند. سلول‌های بنیادی مغزاستخوان که خاصیت نوسازی و تولید رده های مختلف خونساز از قبیل رده اریتروئیدی را دارند، سلول‌های هدف برای انتقال ژن گلوبین به صورت ex vivo هستند (۲۸).

در مطالعات اولیه برای ژن درمانی تالاسمی از وکتورهای رتروویروسی جهت انتقال ژن به سلول‌ها استفاده شد. اما وارد کردن توالی بلند ناحیه تنظیمی جهت به دست آوردن بیان بالا از ژن بتا گلوبین در ساختار وکتور باعث ناپایداری وکتور، بازآرایی ژنومی (Genomic rearrangement)، بیان پایین و متغیر و تیتر پایین ویروس شد. به دلیل مشکلات ایجاد شده، محققین مجبور به استفاده از وکتورهای جایگزین مانند گاما رتروویروس، آلفا ویروس و AAV شدند، اما نتایج رضایت بخشی از این مطالعات نیز حاصل نشد (۲۹, ۳۰).

از آنجایی که ظرفیت انتقال ژن توسط لنتی ویرال وکتورها حدود ۸ کیلوباز است، امروزه وکتورهای لنتی ویروسی به صورت موفقیت آمیز قادر هستند که ژن بتاگلوبین با توالی کامل را همراه با توالی ناحیه تنظیمی به صورت کارامد و پایدار به داخل سلول‌های بنیادی انتقال دهند و از این رو در درمان بیماران مبتلا به بتا تالاسمی مفید واقع شوند (۳۱). از مزایای دیگر لنتی ویروس‌ها که مزیت بسیار مهمی محسوب می‌شود، ارایه موثر ژن‌ها به هر دو نوع سلول هدف در حال تقسیم و آن هایی که تقسیم نمی شوند (به دلیل توانایی نفوذ Preintegration complex آنها از غشا سالم هسته) و عدم ایجاد پاسخ ایمنی ناخواسته است (۳۲).

## مطالعات پیش بالینی

در چند سال اخیر محققان زیادی، وکتورهای لنتی ویروسی مختص رده اریتروئیدی، حامل ژن بتاگلوبین طراحی کرده‌اند که نتایج درمانی رضایت‌بخشی از تزریق سلول‌های بنیادی خون‌ساز به صورت ex vivo به مدل‌های موشی به دست آمده است.

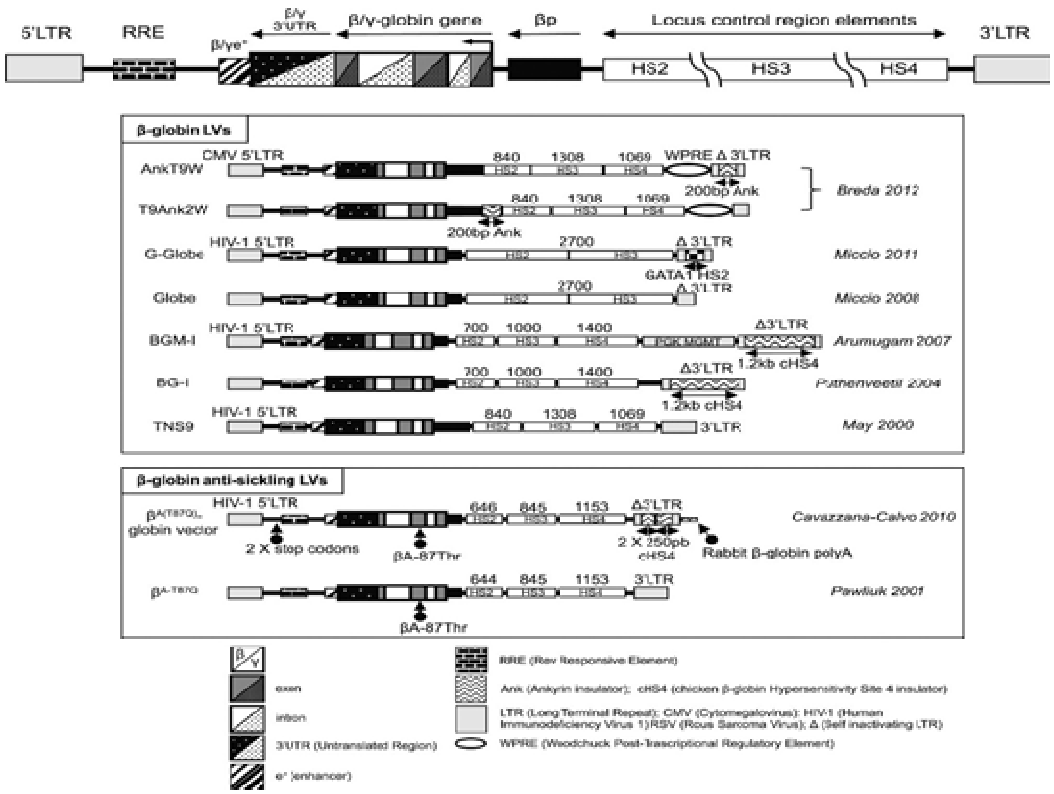
در مطالعه‌ای که توسط گروه May و همکارانش در سال ۲۰۰۰ انجام شد وکتور TNS9 طراحی شد که در آن منطقه پلی آدنیلاسیون مخفی در اینترون ۲ حذف شده و ژن بتاگلوبین با پروموتر و beta globin 3' enhancer و ناحیه تنظیمی (H2, H3, H4) در ساختار وکتور وارد شد. بیان ژن بتاگلوبین از وکتور TNS9 مختص رده اریتروئیدی بود و در مدل موشی $Hbb^{th3+}$ باعث افزایش سطح هموگلوبین پلاسما تا ۷/۴mmol/l با Vector Copy Number(VCN) ۰/۸ در مقایسه با موش درمان نشده که سطح هموگلوبین آن ۵ mmol/l بود، شد. با توجه به این نتایج و این نکته که بعد از ۴۰ هفته این وکتور پایدار بود و همچنین سایز طحال و سطح آهن در کبد مدل موشی $Hbb^{th3+}$ کاهش یافته بود به این نتیجه رسیدند که می‌توان از این وکتور در درمان استفاده کرد (۳۳, ۳۴).

Liowski و همکارانش تغییرات دیگری برروی این وکتور انجام دادند و توالی HS1 را نیز به این وکتور اضافه کردند که باعث افزایش سطح بیان بتاگلوبین به میزان ۵/۹mmol/l شد (۳۵).

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11 ]
[ DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.1.8 ]
[ DOI: 10.29252/iau.30.4.341 ]

**جدول ۱.** خلاصه ای ازنتایج مطالعات پیش بالینی مختلف که از وکتور لنتی ویروسی در ژن درمانی بتاتالاسمی استفاده کردند.

| Reference | Globin gene | LCR-elements | Mouse model | Serum Hb increase | VCN |
|---|---|---|---|---|---|
| May et al. | β-globin | HS2,3,4 | $Hbb^{th3+}$ | 2.4mmol/L | 0.8 |
| Lisowski et al. | β-globin | HS1,2,3,4 | Hbbth3/+ | 2.5mmol/L | 0.4 |
| Imren et al. | β-globin | HS2,3,4 | $THAL/Hbb^{th1}$ | 2.4mmol/L | 3 |
| Micco et al. | β-globin | HS2,3 | Th3/th3 FLCs | 4.1 mm0l/L | 4 |
| Puthenweetil et al. | β-globin | Chicken HS4 | $\beta 2m^{null}$ NOD-SCID | N/A | N/A |




**شکل ۶.** طرح وکتورهای لنتی ویروسی مختلف که توسط گروه‌های بحث شده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این وکتورها به دو گروه تقسیم شده‌اند؛ یک گروه وکتورهای بیان کننده ژن بتاگلوبین و گروه دیگر بیان کننده ژن بتاگلوبین که خاصیت آنتی سایکلینگ دارند.

Imren و همکارانش نیز ژن بتاگلوبین را در ساختار وکتوری که برای درمان کم خونی داسی شکل طراحی شده بود، وارد کردند. در موش های $THAL/Hbb^{th1}$ سطح هموگلوبین تولید شده از این وکتور ۷/۴ mmol/l بود و به مدت ۷ ماه پایدار بود، اما این نتایج با VCN=۳ به دست آمده بودند (۳۱)

Micco و همکارانش در سال ۲۰۰۸ وکتور متفاوت دیگری به نام GLOBE vector ارائه دادند. در آن از ۲/۷ kb توالی تنظیمی ($HS_3$، $HS_2$)، ژن بتاگلوبین همراه با ۲۶۵ bp از انتهای ′۵ و ۳۰۰bp از انتهای ′۳ ژن بتاگلوبین در وکتور لنتی ویروسی قرار داده شد. از طرفی این وکتور دستخوش حذفی ۴۰۰bp در منطقه LTR به منظور افزایش ایمنی قرار گرفته بود. این وکتور باعث افزایش سطح بیان هموگلوبین تا ۶/۳۳mmol/l در مدل موشی th3/+ شد. همچنین بررسی مغزاستخوان نشان داد که ۴ کپی از هر وکتور در سلول‌ها وجود دارد (۳۶).

Putenveetil و همکارانش در طی مطالعاتی که در سال ۲۰۰۳ داشتند وکتوری طراحی کردند که در قسمت LTR آن 4 Chicken hypersensitive site (cHS4) وارد شده بود. این وکتور به سلول‌های +CD34 که از افراد مبتلا به بتاتالاسمی جدا شده بود منتقل شد و توانستند در شرایط in vivo فنوتیپ تالاسمی ماژور را به تالاسمی اینترمدیا تبدیل کنند (جدول ۱) (شکل ۶) (۳۷).

وکتورهای مشابه دیگری ساختاری همانند TNS9 دارند و ژن HBB یا HBG را کد می‌کنند (شکل ۷)، مانند globin-lentiviral vector $\beta^{A-T87Q}$ یا B87 و $B^{AS3}$ که به ترتیب ژن گلوبینی را سنتز می‌کنند که در کدون شماره ۸۷ در B87 و

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11 ]
[ DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.1.8 ]
[ DOI: 10.29252/iau.30.4.341 ]

کدون‌های ۸۷،۲۲ و ۱۶ در $B^{AS3}$ جهشی صورت گرفته و گلوبینی را سنتز می‌کنند که خاصیت anti-sickling دارند یعنی از پلی مریزاسیون هموگلوبین S جلوگیری می‌کنند. بنابراین می‌توانند هم در بتا تالاسمی و هم در کم خونی داسی شکل مفید باشند (۳۸).

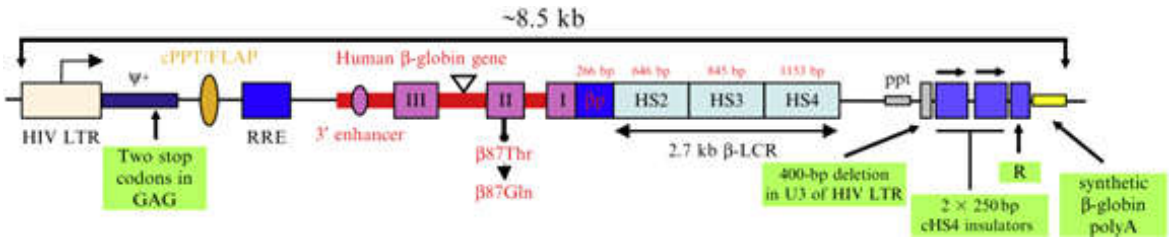
Breda و همکارانش در سال ۲۰۱۱ وکتور AnkT9W را طراحی کردند. این وکتور با تغییراتی که بر روی وکتورT9W اعمال گردید، طراحی شد. در منطقه LTR ۲۰۰bp ازپروموتر ژن انکرین به عنوان عایق، در منطقه LTR جایگزین شد. این جایگزینی نه تنها باعث افزایش میزان بیان ژن بتاگلوبین سالم در ساختار وکتور شد، بلکه باعث القاء بیان ژن در مراحل اولیه تمایز سلول‌های اریتروئیدی شد که یکی از شاخص‌های لازم و ضروری برای کارایی بالای ژن درمانی است (۳۹).

در تمامی این مطالعات، توالی ژن بتا گلوبین و توالی‌های تنظیمی آن از قبیل نواحی HS، از اجزاء ثابت در تمامی وکتورهای ویروسی هستند؛ بنابراین اندک تفاوتی در وکتورهای طراحی شده توسط گروه‌های مختلف به چشم می‌خورد. از این موارد اختلاف و تنها مواردی که منجر به افزایش کارایی هر کدام از آنها می‌شود، طول هر ناحیه تنظیمی و insulator های به کار رفته است.

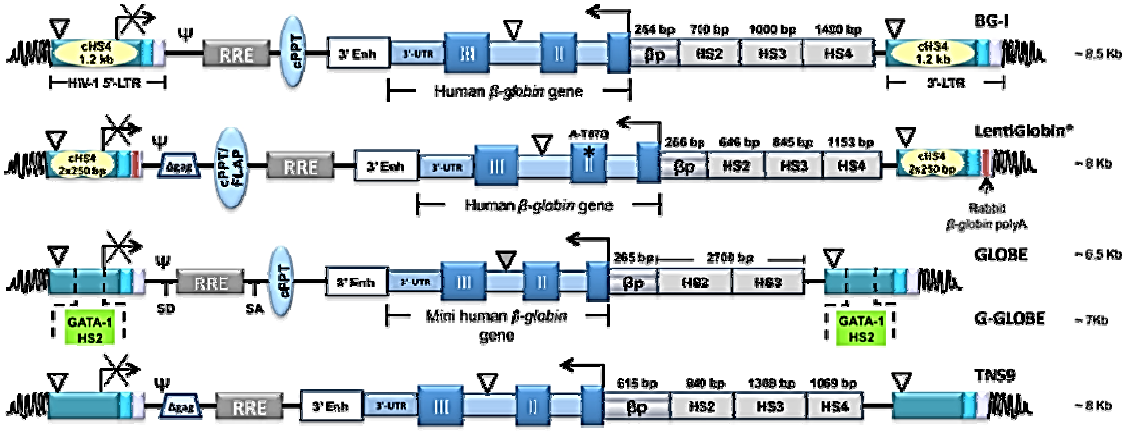
## کارآزمایی بالینی

اولین تلاش برای استفاده از وکتور لنتی‌ویروسی $\beta^{A\text{-}T87Q}$ (HPV569) در انتقال ژن HBB به سلول‌های بنیادی بیماران در سال ۲۰۰۶ انجام شد. این کارآزمایی بالینی LG001 نام‌گذاری شد. لنتی ویروس مورد استفاده حاوی قطعه بزرگی از منطقه کنترل ژن بتاگلوبین (LCR) به همراه ۲۵۰bp از هسته chicken HS4 به عنوان عایق در LTR خود بود (شکل ۷) (۴۰ ,۷).

در سال ۲۰۱۰ Philipp Leboulch و Marina Cavazzana-Calvo اعلام داشتند که با استفاده از وکتور لنتی ویروسی خود تحت عنوان $\beta^{A\text{-}T87Q}$ که دارای خاصیت anti-sickling است (که در مورد آن بحث شد) توانستند نوجوان ۱۸ ساله مبتلا به بیماری بتاتالاسمی از نوع $^{E}\beta/^{0}\beta$-thalassemia را بعد از گذشت ۳ سال و هم اکنون پس از گذشت ۱۱ سال درمان کنند. فرم $^{E}\beta/^{0}\beta$ نوعی از تالاسمی است که یک آلل دچار موتاسیون است ($^{E}\beta$) و آلل دیگر کاملا از کار افتاده است ($^{0}\beta$)؛ لذا تنها راه بهبود علائم این بیمار تزریق مداوم خون است. سطح هموگلوبین فرد به سطح ثابت ۹ $gdL^{-1}$ رسید و مهم‌تر اینکه این فرد بعد از اتمام دوره ی درمانی خود دیگر نیازی به تزریق خون مداوم نداشت. این گروه برای اولین بار فردی مبتلا به نوع شدید بتاتالاسمی را با روش ژن درمانی و آن هم




**شکل ۷.** طرحی از وکتور HPV569 لنتی ویروسی مورد استفاده توسط Cavazzana و همکاران (۴۴)




**شکل ۸.** شکل شماتیک از توالی وکتورهای مورد استفاده در کارآزمایی بالینی (۴۹)

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11 ]
[ DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.1.8 ]
[ DOI: 10.29252/iau.30.4.341 ]

از طریق وکتورهای لنتی ویروسی به طور کامل و قطعی درمان کردند (۴۳-۴۱).

از آنجایی که در وکتور HPV569 از دو توالی CHS4 ۲۵۰bp به عنوان Insulator استفاده شده بود و این دو توالی باعث ناپایداری ژنوم ویروس و از طرفی باعث کاهش تیتر ویروس شده بود، در وکتور جدید این توالی را از ساختار وکتور حذف کردند و در مرحله بعد جهت افزایش تیتر لنتی ویروس و افزایش کارایی ترانسداکشن در قسمت3'LTR از پروموتر ژن CMV (Cytomegalovirus ) استفاده شد. وکتور جدید BB305 نامگذاری شد. در سال ۲۰۱۳ ثبت نام در کار آزمایی بالینی این وکتور در کشورهایی مانند آمریکا، تایلند، استرالیا و فرانسه شروع شد. کارآزمایی بالینی این وکتور ,HGB-204 HGB-206 , HGB-205 نامگذاری شد. تا به امروز ۲۶ نفر در این کارآزمایی بالینی ثبت نام کرده‌اند و تنها ۲۲ نفر از آنها وارد ژن درمانی شده‌اند. ۱۵ نفر از ۲۲ بیمار مبتلا به بتاتالاسمی بعد از دریافت درمان به طور کلی از تزریق خون بی‌نیاز شدند و ۷ نفر دیگر نیز که اغلب مبتلا به انواع خیلی شدید بیماری بودند، توانستند که دفعات تزریق را کمتر کنند. در طول ۳ و نیم سال اثرات درمان در بیماران کمرنگ نشده بود و بدون دریافت خون به زندگی خود ادامه می‌دادند. در سال ۲۰۱۹ این ژن درمانی توسط شرکت بلوبرد تحت نام Zynteglo، موفق به دریافت تاییدیه آژانس دارویی اروپا (EMA) شد و انتظار می رود در سال ۲۰۲۰ تاییدیه FDA را بگیرد (۴۷-۴۵).

کار آزمایی بالینی دیگری با وکتور TNS9.3.55 در سال ۲۰۱۲ در آمریکا شروع شده است و ۴ نفر در این کارآزمایی ثبت نام کرده‌اند. کارآزمایی بالینی دیگری در کشور ایتالیا با وکتور GLOB در سال ۲۰۱۵ شروع شده که ۷ نفر در این کارآزمایی ثبت نام کرده‌اند (شکل ۸) (۴۸-۴۵).

## نتیجه گیری

ژن درمانی با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی می‌تواند گزینه امیدوار کننده درمانی باشد. اولین ژن درمانی لنتی ویروسی با نام تجاری (CTL019، Kymriah) Tisagenlecleucel در ایالات متحده برای درمان کودکان و بزرگسالان مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستیک در سال ۲۰۱۷ مورد تایید قرار گرفت. اخیرا نیز چندین پروژه دیگر سلول درمانی لنتی ویروسی در حال توسعه و مطالعه هستند (۵۰).

وکتورهای نسل سوم لنتی ویروس که SIN نامیده می‌شوند در مطالعاتی برای انتقال ژن به سلول‌های بنیادی و سلول‌های T استفاده شدند. نتایج آنها حاکی از ایمنی به کارگیری این وکتورها جهت ژن درمانی است. اگرچه از لحاظ تئوری پتاسیل ایجاد سرطان برای وکتورهای لنتی ویروسی همچنان وجود دارد، اما تاکنون از مطالعات ژن درمانی با لنتی ویروس و حتی HIV، هیچ موردی از سرطان گزارش نشده است.

در مجموع، با پیشرفت‌هایی که با استفاده از تکنیک‌های ژن درمانی به دست آمده است، اگر ایمنی، اثربخشی و پایدار بودن نتایج این مداخلات تایید شود، محققان امیدوار هستند که نسبت به گذشته مداخلات جدیدی برای بیماران بتاتالاسمی داشته باشند و درمان‌های جدید می‌توانند تاثیر زیادی بر مدیریت شرایط بالینی این بیماران در آینده‌ای نزدیک داشته باشند.

روش‌های دیگری که برای ژن درمانی بتاتالاسمی درحال حاضر مورد بررسی هستند، شامل القا تولید گاماگلوبین با استفاده از داروها یا دستکاری‌های ژنتیکی از طریق ایجاد تداخل در مسیر BCL11A توسط فن آوری های CRISPR / Cas9 ، Zinc Finger Nuclease(ZFN) و یا Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) هستند (۴, ۵۱).

## *REFERENCES*


1. Finotti A, Breda L, Lederer CW, Bianchi N, Zuccato C, Kleanthous M, et al. Recent trends in the gene therapy of beta-thalassemia. J Blood Med 2015; 6:69-85.

2. Sankaran VG. Targeted therapeutic strategies for fetal hemoglobin induction. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2011; 2011:459-65.

3. Rezaee AR, Banoei MM, Khalili E, Houshmand M. Beta-Thalassemia in Iran: new insight into the role of genetic admixture and migration. ScientificWorldJournal 2012;2012:635183.

4. Origa R. β-Thalassemia. Genet Med 2017; 19:609.

5. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. Nature Rev 2001;2:245-55.

6. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. Genet Med 2010; 12:61-76.


[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11 ]
[ DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.1.8 ]
[ DOI: 10.29252/iau.30.4.341 ]

7. Ferrari G, Cavazzana M, Mavilio F. Gene therapy approaches to hemoglobinopathies. Hematol Oncol Clin 2017; 31:835-52.

8. Fibach E, Rachmilewitz EA. Pathophysiology and treatment of patients with beta-thalassemia–an update. F1000Res. 2017;6.

9. Azami M, Parizad N, Sayehmiri K. Prevalence of hypothyroidism, hypoparathyroidism and thefrequency of regular chelation therapy in patients with thalassemia major in Iran: A systematic review and meta-analysis study. Iran J Ped Hematol Oncol 2016; 6:261-76.

10. Farrell CM, Grinberg A, Huang SP, Chen D, Pichel JG, Westphal H, et al. A large upstream region is not necessary for gene expression or hypersensitive site formation at the mouse β-globin locus. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:14554-9.

11. Origa R. Beta-thalassemia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Editors. Molecular Genetics: Lora JH Bean and Karen Stephens. Anne Amemiya, Genetic Counseling. GeneReviews®[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2018.

12. Taher AT, Viprakasit V, Musallam KM, Cappellini MD. Treating iron overload in patients with non-transfusion-dependent thalassemia. Am J Hematol 2013;88:409-15.

13. Weatherall DJ, Clegg JB, Editors. The thalassaemia syndromes. 4th ed. Malden, MA: Blackwell Science; 2001.

14. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood 1994; 84:643-9.

15. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. N Engl J Med 1994; 330:1639-44.

16. Sankaran VG, Nathan DG. Thalassemia: an overview of 50 years of clinical research. Hematol Oncol Clin North Am 2010; 24:1005-20.

17. Finotti A, Breda L, Lederer CW, Bianchi N, Zuccato C, Kleanthous M, et al. Recent trends in the gene therapy of β-thalassemia. J Blood Med 2015; 6:69.

18. Pariente N, Mao SH, Morizono K, Chen IS. Efficient targeted transduction of primary human endothelial cells with dual-targeted lentiviral vectors. J Gene Med 2008; 10:242-8.

19. Annan AC, Fisher PB, Dent P, Siegal GP, Curiel DT. Gene therapy in the treatment of human cancer. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, editors. The molecular basis of human cancer. New York: SpringerLink; 2017. P.811-41.

20. Collins M, Thrasher A. Gene therapy: progress and predictions. Proc Biol Sci 2015; 1821:282.

21. Hatefi A, Canine BF. Perspectives in vector development for systemic cancer gene therapy. Gene Ther Mol Biol 2009; 13:15-9.

22. Kane JR, Miska J, Young JS, Kanojia D, Kim JW, Lesniak MS. Sui generis: gene therapy and delivery systems for the treatment of glioblastoma. Neuro Oncol 2015; 17:ii24-36.

23. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. J Gene Med 2018;20:e3015.

24. Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. J Pathol 2006; 208:299-318.

25. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. Nature 2015; 526:351-60.

26. Breckpot K, Aerts J, Thielemans K. Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. Gene Ther 2007; 14:847-62.

27. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. Biochem J 2012; 443:603-1.

28. Sadelain M, Riviere I, Wang X, Boulad F, Prockop S, Giardina P, et al. Strategy for a multicenter phase I clinical trial to evaluate globin gene transfer in beta thalassemia. Ann Ny Acad Sci 2010; 1202:52-8.

29. Nienhuis AW, Persons DA. Development of gene therapy for thalassemia. Cold Spring Harb Perspect Med 2012; 2: 011833.

30. Quek L, Thein SL. Molecular therapies in β□thalassaemia. Br J Haematol 2007; 136:353-65.

31. Imren S, Payen E, Westerman KA, Pawliuk R, Fabry ME, Eaves CJ, et al. Permanent and panerythroid correction of murine β thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:14380-5.

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11 ]

[ DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.1.8 ]

[ DOI: 10.29252/iau.30.4.341 ]

32. Naldini L, Bloemer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science 1996; 272:263-7.

33. May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, Gaensler KM, Luzzatto L, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. Nature 2000; 406:82-6.

34. May C, Rivella S, Chadburn A, Sadelain M. Successful treatment of murine beta-thalassemia intermedia by transfer of the human beta-globin gene. Blood 2002; 99:1902-8.

35. Lisowski L, Sadelain M. Locus control region elements HS1 and HS4 enhance the therapeutic efficacy of globin gene transfer in beta-thalassemic mice. Blood 2007; 110:4175-8.

36. Miccio A ,Cesari R, Lotti F, Rossi C, Sanvito F, Ponzoni M, et al. In vivo selection of genetically modified erythroblastic progenitors leads to long-term correction of beta-thalassemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:10547-52.

37. Puthenveetil G, Scholes J, Carbonell D, Qureshi N, Xia P, Zeng L, et al. Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. Blood 2004; 104:3445-53.

38. Mansilla-Soto J, Riviere I, Boulad F, Sadelain M. Cell and gene therapy for the beta-thalassemias: advances and prospects. Hum. Gene Ther 2016; 27:295-304.

39. Breda L, Casu C, Gardenghi S, Bianchi N, Cartegni L, Narla M, et al. Therapeutic hemoglobin levels after gene transfer in beta-thalassemia mice and in hematopoietic cells of beta-thalassemia and sickle cells disease patients. PloS one 2012; 7:32345.

40. Bank A, Dorazio R, Leboulch P. A phase I/II clinical trial of beta globin gene therapy for beta thalassemia. Ann N Y Acad Sci 2005; 1054:308-16.

41. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, et al. Transfusion independence and hmga2 activation after gene therapy of human [bgr]-thalassaemia. Nature 2010; 467:318-22.

42. Riegman A, de Wringer M. The current status of Lentiviral gene delivery in beta-Thalassemia Major. Blood 1988; 331:35–41.

43. Coquerelle S, Ghardallou M, Rais S, Taupin P, Touzot F, Boquet L, et al. Innovative curative treatment of βeta-thalassemia: cost-efficacy analysis of gene therapy versus allogenic hematopoietic stem cell transplantation. Hum Gene Ther 2019; 30:753-761.

44. Payen CE, Negre O, Beuzard Y, Hehir K, Leboulch P. Lentivirus Vectors in beta -Thalassemia. Method Enzymol 2012; 507:109-24.

45. Negre O, Eggimann A-V ,Beuzard Y, Ribeil J-A, Bourget P, Borwornpinyo S, et al. Gene therapy of the β-hemoglobinopathies by lentiviral transfer of the βA (T87Q)-globin gene. Hum. Gene Ther 2016; 27:148-65.

46. Cavazzana M, Antoniani C, Miccio A. Gene therapy for β-hemoglobinopathies. Mol Ther 2017; 25:1142-54.

47. Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, Rasko JE, Ribeil J-A, Hongeng S, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent β-thalassemia. N Engl J Med 2018; 378:1479.

48. Marktel S, Cicalese MP, Giglio F, Scaramuzza S, Calbi V, Casiraghi M, et al. Gene therapy for Beta thalassemia: preliminary results from the PHASE I/II Tiget-Bthal trial of autologous hematopoietic stem cells genetically modified with GLOBE lentiviral vector. Blood 2017; 130:355. [Abstract]

49. Drakopoulou E, Papanikolaou E, Georgomanoli M, P Anagnou N. Towards more successful gene therapy clinical trials for β-thalassemia. Curr Mol Med 2013; 13:1314-30.

50. Milone MC, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. Leukemia 2018; 32:1529-41.

51. Khosravi MA, Abbasalipour M, Concordet J-P, Vom Berg J, Zeinali S, Arashkia A, et al. Targeted deletion of BCL11A gene by CRISPR-Cas9 system for fetal hemoglobin reactivation: A promising approach for gene therapy of beta thalassemia disease. Eur J Pharmacol 2019; 854:398-405.

[ Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-11 ]

[ DOR: 20.1001.1.10235922.1399.30.4.1.8 ]

[ DOI: 10.29252/iau.30.4.341 ]