BRIEF REPORT

Specific Markers of Staphylococcus aureus and Escherichia coli VBNC in Patients with Rheumatoid Arthritis

Zeinabe Zarifmanesh[1,2],
Ramezanali Ataee[3,4],
Gholam Hossein Alishiri[5],
Javad Arasteh[6]

[1] MSc in Microbiology, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3] Professor, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Clinical Research Development Committee, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Professor, Department of Rheumatology, Faculty of Medicine, Chemical Injuries Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[6] Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received August 23, 2021 ; Accepted June 27, 2022)

Abstract

Background and purpose: Recent studies suggest that the viable but nonculturable (VBNC) bacteria could cause inflammatory diseases. The aim of this study was to detect and investigate the expression of *nuc* and *rfbE* genes in blood samples of patients with rheumatoid arthritis (RA).

Materials and methods: In this experimental study, 102 blood samples were collected from patients with RA and universal and specific primers were designed. Then, the genome was extracted and PCR reaction was performed to confirm the presence of universal and specific genes. Finally, RT-Real Time PCR reaction was carried out to evaluate the expression of marker genes associated with VBNC bacteria. Data were grouped and analyzed descriptively.

Results: PCR showed *nuc* and *rfbE* genes in 54 (52.9%) and 12 samples, respectively, while according to RT-Real Time PCR these genes were expressed in 80% of the blood samples of patients with RA.

Conclusion: In current study, the VBNC state of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were present in the blood samples of patients with RA. Accordingly, and due to the pathogenicity of VBNC bacteria, different diagnostic methods and treatments should be considered for RA.

Keywords: rheumatoid arthritis, VBNC, RT-Real Time PCR, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (211): 90-96 (Persian).

Corresponding Author: Ramezan Ali Ataee - Faculty of Medicine, Applied Microbiology Research Center, Systems Biology and Poisonings Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (E-mail: ataee@bmsu.ac.ir, ataee216@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-16]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 211 مرداد سال 1401 (96-90)

بررسی مارکرهای اختصاصی *استافیلوکک اورئوس* و *اشریشیا کولی* VBNC در خون بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید

زینب ظریفمنش[1,2]
رمضانعلی عطایی[3,4]
غلامحسین علی‌شیری[5]
جواد آراسته[6]

چکیده

سابقه و هدف: اخیراً مطالعاتی در زمینه وجود باکتری‌های (Viable But Non Culturable(VBNC و نقش آن‌ها در ایجاد بیماری‌های التهابی گزارش شده است. این مطالعه، با هدف ردیابی و بیان ژن‌های *nuc* و *rfbE* در خون بیماران آرتریت روماتوئید، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، 102 نمونه خون از بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید جمع‌آوری شد و پرایمرهای عمومی و اختصاصی طراحی گردید. به منظور تأیید حضور ژن‌های عمومی و اختصاصی، واکنش PCR و جهت بررسی بیان ژن‌های معرف (مارکر) باکتری‌های VBNC واکنش RT-Real Time PCR انجام شد. نتایج، گروه‌بندی و به‌صورت توصیفی تحلیل گردید.

یافته‌ها: نتایج بررسی دو ژن *nuc* و *rfbE* با CR، نشان داد که در 54 نمونه از 102 نمونه (52/9 درصد)، ژن اختصاصی *nuc* و در 12 مورد ژن اختصاصی *rfbE* یافت شد. در حالی که با استفاده از روش پیشرفته RT- RT-Real Time PCR در 80 درصد موارد، این ژن‌ها در نمونه‌های خون بیماران بیان شدند.

استنتاج: نتایج این مطالعه، حضور باکتری‌های *اشریشیا کولی* و *استافیلوکک اورئوس* VBNC در خون بیماران آرتریت روماتوئید را نشان داد. بر این اساس و با توجه به تولید سوپر آنتی ژن‌های مختلف و نقش احتمالی آن‌ها در ایجاد بیماری آرتریت روماتوئید، وجود باکتری‌های VBNC در خون بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید، ضرورت تجدیدنظر در روش‌های تشخیص و درمان این بیماری را گوش زد می‌نماید.

واژه های کلیدی: آرتریت روماتوئید، VBNC، RT-Real Time PCR، *استافیلوکک اورئوس* ، *اشریشیا کولی*

مقدمه

آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis) یک بیماری سیستمیک با اتیولوژی نامعلوم است. افراد مبتلا به این بیماری، ممکن است در ابتدا هیچ علامتی از خود نشان ندهند(1). در خصوص علل ایجاد این بیماری

مولف مسئول: رمضانعلی عطایی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج)، مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی کاربردی E-mail: ataee@bmsu.ac.ir ;ataee216@gmail.com
1. کارشناس ارشد میکروب شناسی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی کاربردی، انستیتوی سم شناسی و سیستم بیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
2. واحد مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
3. استاد، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی کاربردی، انستیتوی سم شناسی و سیستم بیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
4. استاد، کمیته توسعه تحقیقات بالینی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
5. استاد، گروه روماتولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی، انستیتوی سم شناسی و سیستم بیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
6. استادیار، گروه بیولوژی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : 1400/6/1 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1400/8/18 تاریخ تصویب : 1401/4/6

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-16]

تئوری‌هـــای متعددی مطرح گردیده اســـت و ارتبـــاط آرتروپاتی‌ها با عوامل عفونی مورد توجه قـرار گرفتـه اسـت زیرا، منجر به فرم حاد آرتریت روماتوئید مـی‌شـود(3،2). این در حالی است که تعیین اتیولوژی برای موارد مـزمن بیماری آرتریت روماتوئید از معضلات بیان شـده اسـت، به ویژه زمانی که نتایج کشت باکتریولوژیک نمونه‌هـای خون و مایع مفصل بیماران منفـی گـزارش گـردد(4). بـا این حال، نتایج بررسی‌های پیشرفته مولکـولی اتیولـوژی باکتریایی و نیز حضور سوپرآنتی‌ژن‌های میکروبی را در خون و مایع مفصل بیمـاران گـزارش نمـوده اسـت(6،5). این نتایج سوال مهمی را برانگیخته است. چـرا بـا وجـود باکتری در نمونه خون و مایع مفصل بیمار در محیط‌های غنـی‌شـده رشـد نمـی‌کنـد؟ در سـال هـای اخیـر وجـود بـاکتری‌هـای پـاتوژن زنـده ولـی غیـر قابـل کشـت (Viable but non-culturable=VBNC) در مـواد غـذایی گزارش شده است(7). این حالت، وضعیتی است کـه در آن باکتری‌ها زنده هستند ولی برخلاف سلول‌های زنده کـه درمحیط‌های کشت تکثیر نموده و کلنی تشکیل مـی‌دهنـد، توانایی رشد در محیط‌های غنـی شـده و اسـتاندارد را از دست داده اند، امـا هنـوز هـم دارای متابولیسـم بیمـاری زایی هستند. بنابراین، ویژگـی غیـر قابـل کشـت بـودن، باعث اختلال در تشخیص این بـاکتری‌هـا بـا روش‌هـای باکتریولوژی معمول مـی‌شـود؛ کـه غیـر از باکتری‌هـای بیماری زای درون سلولی هستند(8). در هـر حـال، بـرای هر یک از باکتری‌های مختلف یـک یـا چنـد بیومـارکر اختصاصی فرم VBNC معرفی شده است، به عنوان مثال بـرای تشـخیص گونـه‌هـای سـالمونلا تیفـی موریـوم و سالمونلا اینتریتیدیس VBNC، ژن رمز کننـده پـروتئین PagC مورد استفاده قرار گرفته است(9). بـه همـین ترتیـب، ژن‌های nuc و rfbE به‌عنوان معرف های حالت VBNC بـاکتری‌هـای *استافیلوکک اورئـوس و اشریشـیا کـولی* گزارش شده است(10،11). نظـر بـه ایـن کـه دو بـاکتری فوق تولیدکننده سوپر آنتـی ژن‌هـای کلاسـیک بـوده و نقش آن‌ها در ایجاد بیماری‌هـای التهـابی گـزارش شـده است. این مطالعه با هدف، ردیابی حضـور ایـن ژن‌هـای معـرف فـرم VBNC در خـون بیمـاران و بیـان آن‌هـا بـا استفاده از روش RT-Real Time PCR، انجام گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعـه تجربـی کـه از فـروردین 1397 الـی اسفند 1399 انجام گرفت، 102 بیمـار مبـتلا بـه آرتریـت روماتوئیـد مراجعـه‌کننـده بـه درمانگـاه رومـاتولوژی بیمارستان فوق تخصصی بقیه الاعظم (عج) توسـط فـوق تخصص روماتولوژی با رعایـت معیارهـای لازم معرفـی شدند(13،12). از همه بیمـاران انتخـاب شـده بـا رضـایت کامل، نمونه خون اخذ گردیـد. نمونـه‌هـا بـه دو بخـش، یک بخش برای استخراج DNA و بخـش دیگـر جهـت استخراج RNA تقسیم شدند.

طراحـی پرایمـر بـا اسـتفاده از تـوالی ژن‌هـای رفرانس موجود در NCBI، زوج پرایمرهای اختصاصـی بـــرای تکثیـــر ژن nuc *اســـتافیلوکک اورئـــوس* Forward 5'-ATGGACGTGGCTTAGCGTAT-3' و Reverese 5'-GCGTTGTCTTCGCTCCAAAT-3' و ژن rfbE *اشـــــریشیـــــا کـــــولـــــی* Forward 5'-GCCCAGTTAGAACAAGCTGA-3' و Revers 5'-CTTTCCTCTGCGGTCCTAGT-3 طراحـی و سنتز شدند.

استخراج DNA و راه اندازی PCR

بـا اسـتفاده از کیـت اسـتخراج DNA شـرکت Maxcell مطـابق دسـتورالعمل ژنـوم اسـتخراج گردیـد. سـپس جهـت ردیـابی بـاکتری‌هـای *اشریشـیا کـولی* و *استافیلوکک* VBNC در نمونـه خـون بیمـاران، PCR بـا پروتکـل 40 سـیکل و بـه‌ترتیـب 95، 58 و 72 درجـه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون، اتصـال و توسـعه قطعـات راه‌اندازی گردید. محصول PCR با ژل آگارز 2 درصـد و 80 میلی‌ولت الکتروفورز اسـتفاده شـد و و تحـت نـور UV باندهای ایجاد شده مشاهده و یک نمونه از هر یک از باندها تعیین سکانس گردید.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-16]

استخراج RNA و انجام Real Time PCR

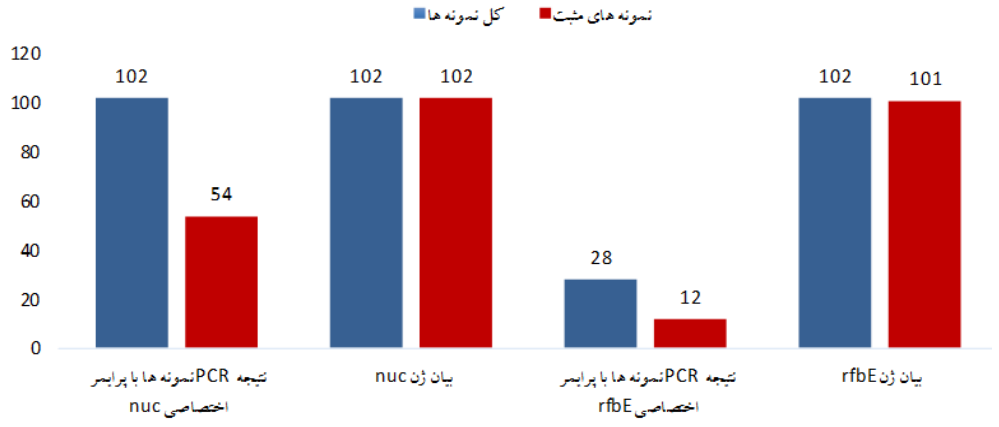
با استفاده از دستورالعمل کیت Maxcell، RNA استخراج و cDNA سنتز شد. همچنین، جهت بررسی میزان و سطح بیان ژن‌های مورد نظر هر یک از نمونه‌ها و مقایسه با ژن رفرانس Houskiping، از روش مولکولی RT-Real Time PCR استفاده گردید. معیارهای ورود و خروج بیماران در این مطالعه منبطق بر مطالعات پیشین بوده است(13،12). انجام این مطالعه با رعایت اصول اخلاقی، و تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) به شماره IR.BMSU.REC. 1396.9991، انجام شد.

یافته ها و بحث

در این مطالعه 102 بیمار (29 نفر مرد و 73 نفر زن با میانگین سنی و انحراف‌معیار 11/15 ± 57/12) که بیش از 5 سال به آرتریت روماتوئید مبتلا بوده و مراجعه مکرر داشتند، بررسی شدند. از 102 نمونه خون بیمار استخراج DNA و RNA انجام و بررسی شدند. نتیجه کاربرد روش‌های مولکولی PCR و RT-real time PCR برای ردیابی و بیان ژن‌های *nuc* و *rfbE* که به ترتیب مربوط به *استافیلوکک اورئوس* و *اشریشیا کولی* VBNC هستند، تعیین سکانس و مقایسه با ترادف‌های رفرانس تأیید گردید. وجود ژن *nuc* در 54 نمونه از 102 نمونه(52/9 درصد)، و وجود ژن *rfbE* را در12 مورد از 28 نمونه(42/8 درصد) منتخب که با پرایمر عمومی16s rRNA تکثیر شده بودند نشان داده شد (تصویر شماره 1).

نتایج RT-real time PCR حاکی از بیان این دو ژن در تمامی نمونه خون‌های جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید بود که مؤید وجود این دو باکتری به فرم VBNC می‌باشد. به این ترتیب، تکثیر ژن‌های هدف با PCR مستقیم، متفاوت از بررسی بیان این ژن‌ها با روش RT-real time PCR بوده است. چنان‌چه ملاحظه می‌گردد، در 100 درصد نمونه‌ها بیان ژن‌های هدف رخ داده است. در حالی که تکثیر آن‌ها با روش PCR معمولی تفاوت نشان داد. هر ساله بر تعداد بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید افزوده می شود، به‌طوری‌که در حال حاضر بیش از 1 درصد جمعیت جهان به این بیماری مبتلا هستند(14). به این ترتیب ضرورت تحقیق در خصوص تعیین اتیولوژی بیماری هر روز افزایش یافته است. لذا، این مطالعه، طراحی و انجام گردید.

نتایج برخی مطالعات حاکی از آن است که جمعیت میکروبی دستگاه گوارش (microbiome) به عنوان یک عامل مهم محیطی می‌تواند بر تظاهرات بالینی بیماری‌های خود ایمن از جمله آرتریت روماتوئید نقش داشته باشد(15).



تصویر شماره 1: مقایسه آنالیز نهایی یافته های حاصل از PCR معمولی و نیز با روش مولکولی پیشرفته RT-real time PCR نشان داده شده است

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-16]

بر این اساس ضرورت استفاده از تکنولوژی‌های پیشرفته اجتناب‌ناپذیر شده است. از طرف دیگر، شواهد علمی و تأییدکننده درمدل‌های تجربی حیوانی نقش میکروبیوتا را در ایجاد آرتریت نشان داده است(16). از آن‌جا که در موارد مزمن آرتریت روماتوئید کشت خون یا کشت مایع مفصل منفی گزارش می‌گردد. لذا، مطالعات فراوانی وجود سوپر آنتی ژن‌های میکروبی را در خون و مایع مفصل بیماران نشان داده شده است(20-17). با این حال، معلوم نیست به چه دلیل، جداسازی باکتری از خون این بیماران با شکست مواجه شده است. همچنین، معلوم نیست به چه دلیل این بیماران علایم باکتریمی و سپتی سمیک را نشان نمی‌دهند. همچنین، اثر سوپر آنتی کلاسیک بر تولید فاکتورهای تشخیص آزمایشگاهی بیماری آرتریت روماتوئید منتشر شده است(21). واژه VBNC یعنی سلول‌های زنده‌ای که توانایی رشد در محیط‌های کشت را از دست داده‌اند در حالی که از نظر متابولیکی فعالیت داشته و فقط قادر به تولید پروتئین‌های مهارکننده رشد باکتری را تولید می‌کنند(22). بنابراین، درک این پدیده، نیازمند تحقیقات بیش‌تری است. همچنین از آن‌جا که تشخیص فرم‌های VBNC نه تنها در بیماری‌های عفونی، بلکه در فراورده‌های غذایی نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. در نتیجه ضرورت تشخیص سریع و دقیق آن‌ها جزء اولویت‌های مطالعاتی است. لذا، به منظور اعتبار بخشی به نتایج مطالعات گذشته، مطالعه موجود طراحی و انجام شد(23). از یافته‌های مهم این مطالعه، آن است که با روش PCR معمولی تنها درصدکمی از ژن‌های هدف قابل ردیابی بوده، در حالی که با بهره‌گیری از روش RT-Real Time PCR درصد ردیابی ژن‌های معرف VBNC افزایش نشان داد. البته، این بدان معنی نیست که با مصرف آنتی‌بیوتیک می‌توان باکتری‌های VBNC موجود در خون بیماران آرتریت روماتوئید را درمان کرد. زیرا، دست‌یابی به روش‌های مؤثر درمان باکتری‌های VBNC در نمونه‌های بالینی مستلزم انجام مطالعات بیش‌تر می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان بقیه‌الله (عج) و همچنین، از رئیس آزمایشگاه بیمارستان بقیه‌الله (عج) و نیز مسئولین مجموعه آزمایشگاه‌های تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Khanna N, Kumar A, Pawar SV. A Review on Rheumatoid Arthritis Interventions and Current Developments. Current drug targets. Curr Drug Targets 2021; 22(4): 463-483.
2. Salehi Nodeh AR, Goodarzi K, Ekhtiyari P, Mirshafiee S. Evaluation of VDRL test in Patients Rheumatoid arthritis. Journal of Payavard Salamat. Payavard 2008; 2(1): 97-101.
3. Anderson KO, Bradley LA, Young LD, McDaniel LK, Wise CM. Rheumatoid arthritis: review of psychological factors related to etiology, effects, and treatment. Psychol Bull 1985; 98(2): 358-387.
4. Ataee RA, Kashefi R, Alishiri GH, Esmaieli D. Staphylococcus aureus enterotoxin D: Absence of bacteria but presence of its toxin. Jundishapur J Microbiol 2015;8(12): e28395.
5. Ataee RA, Golmohammadi R, Alishiri GH, Mirnejad R, Najafi A, Esmaeili D, et al. Simultaneous detection of mycoplasma pneumoniae, mycoplasma hominis and mycoplasma arthritidis in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis by multiplex PCR. Arch Iran Med 2015; 18(6): 345-350.
6. Ataee RA, Mohoseni-Moghadam Z, Salimzadeh A, Latifi AM, Ataee MH, Alishiri GH. Enzyme-linked immunosorbent

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-16]

assay for detection of staphylococcal enterotoxins in synovial fluid of rheumatoid arthritis pateints. Journal of Pure and Applied Microbiology 2013; 7(2): 1113-1119.

7. Robben C, Fister S, Witte AK, Schoder D, Rossmanith P, Mester P. Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts. Sci Rep 2018; 8(1): 15132.
8. Bierne H, Milohanic E, Kortebi M. To Be Cytosolic or Vacuolar: The Double Life of Listeria monocytogenes. Front Cell Infect Microbiol 2018;8:136.
9. Xu J, Suita K, Okuno K, Takaya A, Yamamoto T, Isogai E. Membrane vesicle protein PagC as a novel biomarker for detecting pathogenic Salmonella in the viable but not culturable state. J Vet Med Sci 2018; 80(1): 133-137.
10. Liu Y, Kumblathan T, Uppal GK, Zhou A, Moe B, Hrudey SE, et al. A hidden risk: Survival and resuscitation of Escherichia coli O157:H7 in the viable but nonculturable state after boiling or microwaving. Water Res 2020; 183: 116102.
11. Liao X, Hu W, Liu D, Ding T. Stress Resistance and Pathogenicity of Nonthermal-Plasma-Induced Viable-but-Nonculturable Staphylococcus aureus through Energy Suppression, Oxidative Stress Defense, and Immune-Escape Mechanisms. Appl Environ Microbiol 2021; 87(2): e02380-20.
12. Alishiri GH, Shirbazoo S, Salimzadeh A, Bayat N, Manafi MR, Ataee RA. An evaluation of toxoplasma antibodies in patients with rheumatoid arthritis. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(147): 386-391 (Persian).
13. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. Journal of the American Medical Association 2018; 320(13): 1360-1372.
14. Bergot A-S, Giri R, Thomas R. The microbiome and rheumatoid arthritis. Best Pract Res Clin Rheumatol 2019; 33(6): 101497.
15. Scher JU, Abramson SB. The microbiome and rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol 2011; 7(10): 569-578.
16. Brusca SB, Abramson SB, Scher JU. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. Curr Opin Rheumatol 2014; 26(1): 101-107.
17. Ataee RA, Kashefi R, Alishiri GH, Esmaieli D. Assay of blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis for Staphylococcus aureus enterotoxin D: absence of bacteria but presence of its toxin. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(12): e28395.
18. Ataee RA, Kahani MS, Alishiri GH, Ahamadi Z. Staphylococcal Enterotoxin A Detection from Rheumatoid Arthritis Patients' Blood and Synovial Fluid. Electron Physician 2016; 8(2): 1850-1856.
19. Hammad DBM, Liyanapathirana V, Tonge DPJPo. Molecular characterisation of the synovial fluid microbiome in rheumatoid arthritis patients and healthy control subjects. PLoS One 2019; 14(11): e0225110.
20. Ataee MR, Alishiri GH, Hesampoor Mahalati A, Ataee RA. Study Effects of Staphylococcus aureus Superantigen C on Production of C-Reactive Protein in Rat. Armaghane Danesh 2019; 24(4): 612-625.
21. Mali S, Mitchell M, Havis S, Bodunrin A, Rangel J, Olson G, et al. A proteomic signature of dormancy in the actinobacterium Micrococcus luteus. J Bacteriol 2017; 199(14): e00206-e00217.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-16]

22. Abd El-Aziz NK, Tartor YH, Gharib AAE-A, Ammar AM. Propidium monoazide quantitative real-time polymerase chain reaction for enumeration of some viable but nonculturable foodborne bacteria in meat and meat products. Foodborne Pathog Dis 2018; 15(4): 226-234.

23. Hashemi R, Ataee RA, Alishiri GH, Ghorbanalizadegan M, Mahabadi M, Najafi A. Molecular Detection of Bacterial Etiology of Rheumatoid Arthritis. J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29(173): 33-39 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-02-16]