

تولید پروتئین اینترلوکین ۲ نو ترکیب در مقیاس آزمایشگاهی با استفاده از سیستم بیانی میکروبی

خلاصه

مقدمه: اینترلوکین-۲، سیتوکینی که گسترش سلول‌های T و توسعه فنوتیپی را هدایت می‌کند، نقش مهمی در بهبود زخم ایفا می‌کند. بهترین نقش مطالعه شده برای اینترلوکین-۲ در تأثیرگذاری بر رشد سلول‌های T است. با این حال، انواع سلول‌های دیگر، از جمله فیبروبلاست‌ها، سلول‌های پوستی که وظیفه ترمیم زخم را به عهده دارند، گیرنده اینترلوکین-۲ را بیان می‌کنند و بنابراین ممکن است به اینترلوکین-۲ پاسخ دهند. مطالعات نشان داده‌اند که درمان با اینترلوکین-۲ می‌تواند استحکام پوست ترمیم یافته را بهبود بخشد، که که بیانگر نقش اینترلوکین-۲ را در روند بهبود زخم می‌باشد.

روش مطالعه: در این مطالعه، یک وکتور بیان میکروبی حاوی توالی کدکننده برای IL-2 بهینه ساخته و سازه‌ی مذکور به سویه‌های باکتریایی انتقال یافت. بیان پروتئین نو ترکیب پس از القا با استفاده از روش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ و آنتی‌بادی اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. سپس جهت تخلیص از کروماتوگرافی تمایلی استفاده شد. فعالیت زیستی پروتئین تولیدشده به وسیله‌ی رسم منحنی رشد سلول‌های NIH-3T3 مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: پس از تنظیم مسیر بیانی مناسب، میزان ۸/۰۱ میلی گرم IL-2 به ازای هر لیتر کشت باکتریایی در ارلن تخلیص گردید. IL-2 تخلیص شده دارای ساختار مناسب و فعالیت زیستی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: سویه باکتریایی مورد استفاده می‌تواند IL-2 نو ترکیب تولید و فولدینگ مناسب را ایجاد نماید. IL-2 نو ترکیب تولیدی دارای فعالیت بیولوژیکی است و مسیر تولیدی مقیاس‌پذیر بوده و از نظر اقتصادی به صرفه است.

واژگان کلیدی: IL-2 نو ترکیب، فناوری DNA نو ترکیب، سیستم بیان میکروبی

فرشته سرافرازی اسفندآبادی^۱

آرمین ناظمی زاده^۱

مهدی حصارکی^۱

مسعود حبیبی^۱

محسن فاتح^۲

حسن رسولی^۱

۱. گروه پژوهشی پزشکی بازساختی و زیست فناوری در ترمیم زخم مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی پژوهشکده فناوری‌های زخم و ترمیم بافت یارا، سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران

۲. گروه پژوهشی پزشکی مبتنی بر سبک زندگی مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی سازمان جهاد دانشگاهی علوم پزشکی تهران

نویسنده مسئول: حسن رسولی تلفن: ۰۲۱۶۶۴۶۲۹۱۵
پست الکترونیکی: Rassouli59@gmail.com

مقدمه

پوست اغلب آسیب دیده و باعث آسیب به اپیتلیوم یا آسیب به ساختار آناتومیک طبیعی بافت می شود. زخم ها را می توان براساس ماهیت، ساختار لایه های پوست، فرآیند بهبود و براساس طول مدت بهبود زخم طبقه بندی کرد (Susanto et al., 2022). چهار فرآیند هم پوشانی اصلی در فرآیند بهبود زخم وجود دارد: فازهای هموستاتیک، التهابی، تکثیر و بازسازی (وانگ و همکاران، ۲۰۱۸). فرآیند بهبود زخم شامل پاسخ های سلولی و بیوشیمیایی، از جمله آنتی اکسیدان ها و سیتوکین ها است (ولنار و همکاران، ۲۰۰۹). سیتوکین هایی که در فاز التهابی نقش دارند شامل سیتوکین های پیش التهابی مانند فاکتور نکروز تومور آلفا ($TNF-\alpha$)، اینترلوکین ۱-۱ (IL-1)، IL-6، IL-8 و سلول های ایمنی را به محل زخم هدایت می کند. اینترلوکین گاما و همچنین سیتوکین های ضد التهابی مانند IL-4، IL-10 و IL-13 باعث تحریک آزادسازی ماکروفاژها و تکثیر فیبروبلاست ها می شوند.

(Sarsenova, M., et al. 2022). سلول های فیبروبلاست که برای بستن زخم ها عمل می کنند، IL-2 را نیز در روند بهبود زخم بیان می کنند. IL-2 یک سایتوکین مرتبط با سیستم ایمنی است که تولید سلول های T را تحریک می کند که نقش مهمی در بهبود زخم دارند (Doersch et al., 2017).

فرآیند بهبود زخم نیازمند هماهنگی سلول های ایمنی با سلول های پوست است. IL-2 یک سیتوکین است که در مسیرهای سیگنال دهی مربوط به سیستم ایمنی نقش دارد، نقش مهمی در چندین عملکرد کلیدی سیستم ایمنی ایفا می کند و با چندین سیتوکین برای تعدیل تشکیل و فعال شدن سلول های ایمنی تعامل دارد که می تواند بر بهبود زخم نیز تأثیر بگذارد. IL-2 بیشتر توسط سلول های $CD4+$ T و $CD8+$ در حالت فعال تولید می شود. (Arenas-Ramirez et al., 2013)

علاوه بر این، مهاجرت سلول های لکوسیت و پلاکت نیز با فعال سازی MAPK انجام می شود که نفوذپذیری غشای سلولی را به یون های Ca^{2+} افزایش می دهد و کلاژناز و الاستاز را فعال می کند، که همچنین مهاجرت سلولی را به سمت موقت تحریک می کند ماتریسی که تشکیل شده است سلول های پلاکتی پس از رسیدن به ماتریکس، دگرانولاسیون را تجربه می کنند، سیتوکین ها ترشح می کنند و مسیرهای درونی و بیرونی را فعال می کنند که سلول های نوتروفیل را تحریک می کنند تا به ماتریکس موقت مهاجرت کنند و فاز التهابی را آغاز کنند. ERK برای تنظیم فعال شدن سیگنال های MAPK عمل می کند و تنظیم کننده اصلی مهاجرت انواع مختلف سلول است (He et al., ۲۰۱۲). سیگنال مرگ سلولی ناشی از فعال سازی (AICD) را القا می کند و با تشویق به تمایز سلول های T نابالغ به سلول های T تنظیمی از بیماری های خودایمنی جلوگیری می کند. (Kao et al., ۲۰۱۸). سلول های T تنظیمی نقش مهمی در تمایز سلول های $CD8+$ T ساده به سلول های T موثر و سلول های T حافظه دارند، در نتیجه ایمنی را تقویت می کنند. تولید IL-2 توسط سلول های T توسط

فاکتورهای رشد فیبروبلاست ۱- (FGFs) یا ۲- هدایت می شود که برای بهبود زخم و فرآیندهای رگ زایی مهم هستند. (Kang et al., 2013). IL-2 یک عامل مهم در رشد فیبروبلاست از طریق اتوفژی یا از طریق اجزای زخم ناشی از اندامک های آسیب دیده زخم است که هضم و تخصیص مجدد می یابد ((Zhu and Paul, 2008) در مرحله التهابی فرآیند بهبود زخم، سلول های ایمنی و ماکروفاژها و لنفوسیت های مختلف خارج می شوند. ماکروفاژها بقایای بدن را فاگوسیت کرده و از زخم در برابر عوامل بیماری زا محافظت می کنند که سپس ماتریکس خارج سلولی (ECM) تولید می کنند. لنفوسیت ها و ماکروفاژها همچنین به تولید سیتوکین ها کمک می کنند که سیستم ایمنی را در روند بهبود زخم تحریک می کنند. IL-2 توسط ماکروفاژها، سلول های کمکی T، لنفوسیت های T سیتوتوکسیک و سلول های کراتینوسیت که در روند بهبود زخم نقش دارند بیان شود (نلسون، ۱۹۹۸). بنابراین، بسیاری از سلول های پوست که در سیستم ایمنی نقش دارند، در ترمیم زخم به IL-2 نیاز دارند (Doersch et al., 2017).

مطالعات نشان داده اند که درمان با IL-2 می تواند قدرت پوست را در روند بهبود زخم افزایش دهد؛ (باربول و همکاران، ۱۹۸۶). مطالعه دیگری از IL-2 به شکل کرم به عنوان یک درمان موضعی برای زخم ها در بیماران دیابت نوع ۱ (DM) و بیماران دیابت نوع ۱ کاهش سطح IL-2 را تجربه کردند و باعث ایجاد فاز التهابی طولانی در روند بهبود زخم شد (چان، ۲۰۱۵). علاوه بر این، مشخص شده است که در چندین بیماری که باعث اختلال در ترمیم زخم می شوند، مانند بیماری های مرتبط با خودایمنی مانند لوپوس اریتماتوز سیستماتیک (SLE)، کمبود IL-2 یا آسیب به سیگنالینگ گیرنده IL-2 وجود دارد (Doersch et al., ۲۰۱۷).

ترمیم زخم یک فرآیند بیولوژیکی طبیعی در بدن انسان است که هدف آن بازگرداندن عملکرد و یکپارچگی بافت آسیب دیده است. در این فرآیند، بهبود زخم شامل پاسخ های سلولی و بیوشیمیایی (شامل آنتی اکسیدان ها و سیتوکین ها) است که به صورت موضعی و سیستمیک رخ می دهند. IL-2 یک سیتوکین است که تولید سلول های T را تحریک می کند که نقش مهمی در بهبود زخم دارند. چندین مطالعه نشان داده اند که درمان با IL-2 می تواند قدرت پوست را در روند بهبود زخم افزایش دهد. علاوه بر التیام زخم ها، IL-2 در التیام بیماری های خودایمنی نیز استفاده می شود.

مواد و روش ها

کلونینگ قطعه IL-2 از cDNA

تکثیر قطعه C-terminal cDNA پروتئین Interleukin-2

در این مطالعه تجربی، RNA کل از سلول های خونی انسانی با استفاده از

F 0104) به سلول‌های شایسته *E. coli* سویه BL 21 (DE 3) (Novagen, Madison, WI, USA) منتقل شد. توالی نوکلئوتیدی ترانسژن در pET 28/bFGF با استفاده از توالی‌یابی DNA تأیید شد.

انتقال وکتور حاوی ژن به باکتری و غربالگری جهت اطمینان از ورود وکتور به میزبان

با استفاده از روش کلونینگ شوک حرارتی حامل ژنی به میزبان منتقل گردید. وکتور حاوی ژن پلازمید دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین می‌باشد. پس از مسیر انتقال حامل ژنی، باکتری‌ها به‌منظور غربالگری و حذف باکتری‌هایی که فاقد حامل ژنی بودند به محیط کشت باکتری LB مایع و LB-Agar حاوی آنتی‌بیوتیک اضافه شده و باکتری‌هایی که رشد نموده بودند، به‌منظور ادامه مسیر ذخیره گردید.

بیان و تخلیص IL-2 نو ترکیب

pET32a/IL-2 که پروتئین His6-IL-2 را کد می‌کند به سویه *E. coli* منتقل شد. غلظت‌های مختلف IPTG (۰.۱، ۰.۵، ۱ یا ۱ میلی‌مولار) و دماهای القایی (۳۰ درجه سانتی‌گراد تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد) مورد استفاده قرار گرفت. پس از القا و ۶ ساعت بیان پروتئین His6-IL-2، پروتئین‌های بیشتری را در دمای القایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. بهترین غلظت IPTG، ۰.۱ میلی‌مولار از نظر سطح بیان و تشکیل اینکلوژن بادی تعیین شد. IL-2 نو ترکیب بیان شده توسط کروماتوگرافی تمایلی با ستون Ni-NTA آگارز (اسپانیا، ABT) تخلیص شد. شست‌وشوی ناخالصی‌ها توسط محلول ۲۵ میلی‌مولار ایمیدازول و جداسازی پروتئین هدف بوسیله ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول انجام گردید.

اکثر پروتئین‌های باکتریایی آلاینده در طی مسیر و مراحل شست‌وشو حذف شدند. میزان جداسازی پروتئین‌های متصل شده با شستن بیشتر رزین یا با افزایش غلظت ایمیدازول افزایش پیدا نکرد. پروتئین نو ترکیب IL-2 (تقریباً ۳۷ کیلو دالتون) در فراکسیون‌های ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول به‌دست آمد.

شناسایی پروتئین IL-2 تخلیص شده

پروتئین‌های IL-2 خالص شده با ژل SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ تأیید شد. نتایج نشان داد که پروتئین‌های ما با IL-2 مطابقت دارند.

ژل SDS-PAGE

SDS-PAGE (سدیم دودسیل سولفات-پلی آکریل آمید الکتروفورز ژل) برای بررسی تولید و شناسایی ساختار پروتئین استفاده شد. نمونه‌های پروتئینی پس از مخلوط شدن با بافر نمونه (در هر دو شرایط احیاء و احیاناً شده)، دنا توره شدن در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد و بارگذاری روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد آماده شدند. الکتروفورز در ولتاژ ۱۲۰ ولت انجام

کیت NucleoSpin RNA II (MNC; Germany) استخراج شد. پس از استخراج، RNA کل با DNase بدون (negativ) esaNR، (ASU, AC, dabslraC) تیمار شد تا از حذف کامل DNA ژنومی اطمینان حاصل شود. سنتز رشته اول cDNA با استفاده از آنزیم معکوس ترنسکریپتاز، Super Script III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)، پرایمر اولیگو dT و ۲ میکروگرم RNA کل خالص شده انجام شد. پرایمرهایی که برای تکثیر Interleukin-2 طراحی شدند از بانک ژن (شماره دسترسی CAA01199.1) نوکلئوتیدهای ۴۵۹-۶۱ انتخاب شدند تا بخش N-terminal حذف شود. قطعه C-terminal IL-2 با استفاده از پرایمرهای

pET- IL-2-f (5' AAT TAA GAA TTC GCA CCT ACT TCA AGT TCT AC 3')

۹

-r (5' TAC CAT GAG CTC TCA AGT CAG TGT TGA GA 3') pET- IL-2

تکثیر شد.

این پرایمرها یک سایت محدودکننده EcoRI را در انتهای ۵' و یک سایت محدودکننده SacI را در انتهای ۳' آمپلی کون اضافه می‌کنند. برای تکثیر قطعه، از پلی‌مراز (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) DNA pfx، دستگاه PCR Mastercycler® Gradient (Eppendorf Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany) استفاده شد. مراحل تکثیر شامل مراحل زیر بود: پیش‌انکوباسیون در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه؛ ۳۰ چرخه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه؛ سپس یک مرحله انکوباسیون در ۶۸ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه. پس از آن، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱.۵٪ تجزیه و تحلیل شده و با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید تحت نور فرابنفش (UV) مشاهده شدند.

همسانه سازی قطعه C-terminal cDNA پروتئین Interleukin-2 در وکتور بیانی pET32a

محصول PCR و وکتور pET32a با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده EcoRI و SacI (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) هضم شدند، سپس عمل لیگاسیون انجام شد تا همسانه سازی تکمیل گردد. بیان پروتئین هیستیدین-تگ شده IL-2 که در pET32a کلون شده است، تحت کنترل مستقیم پروموتور TV و ترمیناتور ترنسکریپشن قرار دارد. ساختار وکتور بیان نو ترکیب که ژن IL-2 را حمل می‌کرد (pET32a/IL-2)، با استفاده از روش شوک حرارتی طبق دستورالعمل سازنده (User Protocol TB 009 Rev.)

رشد روبه افزایش، متناسب با افزایش غلظت فاکتور رشد را نشان داد (شکل ۳).

بحث و نتیجه گیری

اینترلوکین ۲-، سیتوکینی که گسترش سلول های T و توسعه فنوتیپی را هدایت می کند، نقش مهمی در بهبود زخم ایفا می کند. بهترین نقش مطالعه شده برای اینترلوکین-۲ در تأثیرگذاری بر رشد سلول های T است. با این حال، انواع سلول های دیگر، از جمله فیبروبلاست ها، سلول های پوستی که وظیفه ترمیم زخم را به عهده دارند، گیرنده اینترلوکین-۲ را بیان می کنند و بنابراین ممکن است به اینترلوکین-۲ پاسخ دهند. مطالعات نشان داده اند که درمان با اینترلوکین-۲ می تواند استحکام پوست بهبود یافته را بهبود بخشد، که که بیانگر نقش اینترلوکین-۲ را در روند بهبود زخم می باشد. علاوه بر این، بیماری هایی که شامل اختلال در ترمیم زخم می شوند، مانند دیابت و لوپوس اریتماتوز سیستمیک، با کمبود اینترلوکین-۲ یا نقص در سیگنال دهی گیرنده اینترلوکین-۲ مرتبط می باشند. اینترلوکین-۲ همچنین یک ابزار مهم با رویکردهای

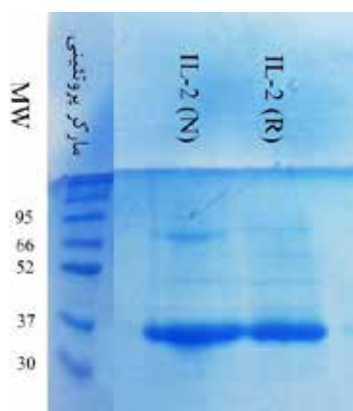
شدت زمانی که قسمت جلویی رنگ به انتهای ژل برسد و سپس رنگ آمیزی Coomassie Brilliant Blue G250 انجام گردید. نتایج نشان دهنده تولید IL-2 (شکل ۱) و تشکیل یک ساختار مونومر (شکل ۲) است.

وسترن بلاتینگ

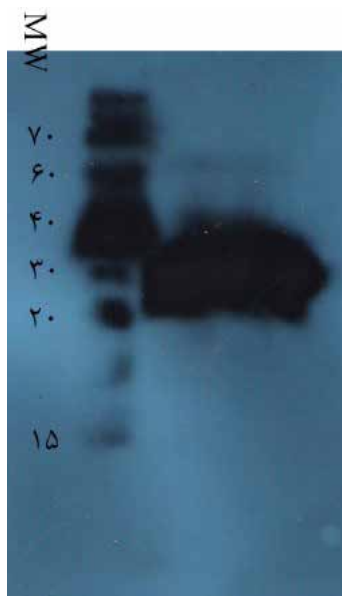
به عنوان آنتی بادی اولیه ضد His Tag (Cat#: 652501 Biolegend) Inc (ایالات متحده آمریکا) برای انجام آنالیز وسترن بلات استفاده شد. آنتی بادی ثانویه (HRP) از نوع IgG ضد موش از بز (cat#: DB9571, DNABiotech Inc., IR IRAN) مورد استفاده قرار گرفت. آنتی بادی Anti-His Tag با رقت ۱:۱۰۰۰ و آنتی بادی ثانویه با رقت ۱:۲۰۰۰ (CMG, IRI) غشای انتقال فلوراید پلی وینیلیدین (PVDF) از شرکت Roche (Life Science, USA) خریداری شد.

تعیین غلظت IL-2 نو ترکیب تخلیص شده

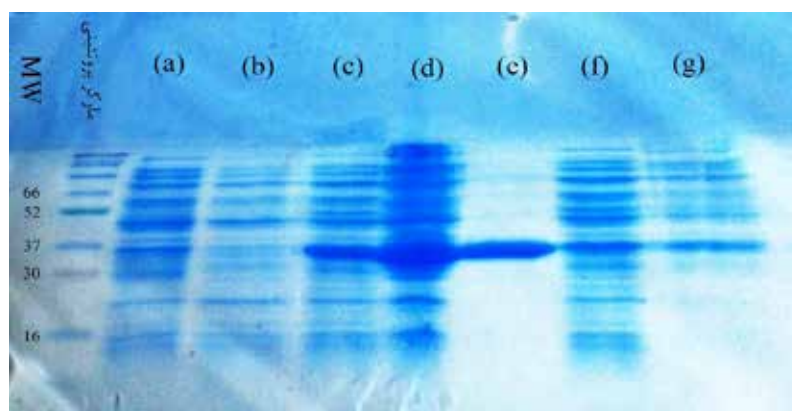
غلظت IL-2 نو ترکیب تخلیص شده توسط آزمون سنجش برادفورد با BSA به عنوان استاندارد بررسی و برابر با ۸/۰۱ میلی گرم IL-2 به ازای



شکل ۲. تجزیه و تحلیل ساختار پروتئین با استفاده از SDS-PAGE. پروتئین (IL-2(N)) پروتئین به شکل احیاناً شده آن (IL-2(R)) پروتئین پس از احیا در شکل کاهش نیافته، یک باند پروتئین در حدود ۶۶ کیلو دالتون تشخیص داده شد، در حالی که در شکل کاهش یافته، نوار تقریباً ۳۷ کیلو دالتون یافت شد.



شکل ۳. آنالیز IL-2 نو ترکیب با استفاده از وسترن بلات (به ترتیب از چپ به راست مارکر، نمونه اینترلوکین ۲ در حالت احیا)



شکل ۱. ژل SDS-PAGE از IL-2 نو ترکیب تولید شده: (a) پروتئوم باکتریایی فاقد وکتور و القاشده با IPTG (b) پروتئوم باکتریایی قبل از القا توسط IPTG (c) پروتئین های محلول پس از القا و IPTG (d) پروتئین های رسوب شده در پلیت پس از حل شدن مجدد توسط اوره (e) پروتئین های خالص شده با کروماتوگرافی تمایلی توسط ستون Ni-NTA آگاروز (f) پروتئین های اضافی عبور یافته از ستون Ni-NTA آگاروز (g) پروتئین های محیط کشت باکتری

هر لیتر کشت باکتریایی محاسبه گردید.

بررسی فعالیت زیستی IL-2 نو ترکیب تولید شده بر سلول های فیبروبلاستی NIH-3T3

برای بررسی عملکرد محصول IL-2 خود، آن را روی کشت NIH-3T3 که رده های سلولی فیبروبلاست مانند مشتق شده از موش NIH Swiss هستند، اعمال کردیم و منحنی رشد آن با استفاده از بررسی تعداد سلول ها به کمک تست MTT در زمان ۲۴ ساعت ترسیم شد. در این آزمایش رشد سلول ها در حضور غلظت های ۴۰۰۶، ۸۰۱۲، ۱۶۰۲۵، ۳۲۰۵، ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ نانوگرم در چاه غلظت IL-2 نو ترکیب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج منحنی



شکل ۴. نمودار استاندارد تست براد فورت

References:

1. Susanto, W. and S. J. Suprpto (2022). "Perawatan luka pada kulit kronis." PT Global Eksekutif Teknologi: 38-39.
2. Sarsenova, M., et al. (2022). "Recent advances to enhance the immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells." *Frontiers in Immunology* 13: 1010399.
3. Velnar, T., et al. (2009). "The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms." *Journal of international medical research* 37(5): 1528-1542.
4. Doersch, K. M., et al. (2017). "The contribution of interleukin-2 to effective wound healing." *Experimental biology and medicine* 242(4): 384-396.
5. Arenas-Ramirez, N., et al. (2015). "Interleukin-2: biology, design and application." *Trends in immunology* 36(12): 763-777.
6. Kao, A. M., et al. (2018). "Prevention and treatment strategies for mesh infection in abdominal wall reconstruction." *Plastic and reconstructive surgery* 142(3S): 149S-155S.
7. Kang, R., et al. (2013). "Autophagy is required for IL-2-mediated fibroblast growth." *Experimental cell research* 319(4): 556-565.
8. Zhu, J. and W. E. Paul (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 112(5): 1557-1569.
9. Barbul, A., et al. (1986). "Interleukin 2 enhances wound healing in rats." *Journal of Surgical Research* 40(4): 315-319.
10. He, M., et al. (2012). "Brevescapine inhibits high glucose-induced proliferation and migration of cultured vascular smooth muscle cells of rats via suppressing the ERK1/2 MAPK signaling pathway." *Acta Pharmacologica Sinica* 33(5): 606-614.



شکل ۵. منحنی رشد سلول های NIH 3T3 در حضور IL-2

تعدیل کننده و به عنوان درمان های بالقوه مورد استفاده در مطالعات پروتئومیک و بیودارویی است. این پژوهش به منظور تولید اینترلوکین-۲ نو ترکیب در یک سیستم بیان میکروبی طراحی گردید. در این پژوهش پس از طراحی حامل ژنی مناسب برای ژن IL-2، این حامل به باکتری میزبان منتقل شد و پس از تنظیم مسیر بیانی مناسب (باتوجه به میزبان مورد استفاده و حامل ژنی)، میزان ۸/۱۰ میلی گرم IL-2 به ازای هر لیتر کشت باکتریایی در ارلن تخلیص گردید. سپس فعالیت زیستی IL-2 تخلیص شده به روش رسم منحنی رشد سلولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی زیست سنجی نشان دهنده فعالیت برای این پروتئین می باشد.

قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشکده فناوری های زخم و ترمیم بافت یار، سازمان جهاد دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. در این مقاله تضاد منافع وجود ندارد.