

نقش ان-استیلاسیون گالاکتوز و گلوکز در تکامل فولیکول

سیدمحمد حسینی پناه*^۱(Ph.D)، محمد بربرستانی^۲(Ph.D)، علی رضا فاضل^۳(Ph.D)، مهرا^۴ حبیبی رضایی^۴(Ph.D)، مصطفی حسینی^۵(Ph.D)

- ۱- دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
- ۲- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
- ۳- دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح
- ۴- دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، مدیریت بیوتکنولوژی
- ۵- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه آمار

چکیده

سابقه و هدف: از آنجایی که گلیکوکونژوگیت‌ها، خاصاً زنجیره قندیشان نقش خاصی در تکامل، بازی می‌کنند؛ این تحقیق جهت پی بردن به ترکیب شیمیایی منطقه شفاف و ارتباط آن با تکامل فولیکول انجام گرفته است. مواد و روش‌ها: جهت انجام این تحقیق، تخمدان موش‌های بالغ را خارج نموده و پس از آماده‌سازی به روش معمول بافت‌شناسی، نمونه‌ها با ضخامت سه میکرون مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین از لکتین‌های متصل به HRP با روش اختصاصی لکتین هیستوشیمیایی جهت مشخص کردن ساختمان گلیکوکونژوگیت‌های منطقه شفاف و تغییر ترکیبات آن در طی چرخه تخمدانی، استفاده شده است. نتایج: سه لکتین WGA، DBA و PNA برای ان-استیلاسیون گالاکتوز و گلوکز انتخاب شدند که این موضوع را اثبات نمودند.

نتیجه‌گیری: این مشاهده گواهی است بر این که گلیکوکونژوگیت‌های حاوی ان-استیل گالاکتوز آمین (GalNAc) و ان-استیل گلوکز آمین (GlcNAc) در منطقه شفاف اهمیت ساختمانی در تکامل فولیکول دارند که از آن می‌توان در جهت ناباروری با منشاء جنس مؤنث استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: گلیکوکونژوگیت، تخمدان، لکتین، منطقه شفاف.

مقدمه

مورد علاقه محققین قرار گرفته و در هیستوشیمی، مورد استفاده واقع شده‌اند. همچنان‌که جهت تعیین محل منوساکاریدها و الیگوساکاریدها در مخلوط ناهمگن بقایای کربوهیدرات‌ها در روی سطح یا درون سلول و

لکتین‌ها، پروتئین‌هایی هستند که به‌طور طبیعی ایجاد و به‌طور انتخابی با پیوندهای غیرکوالانسی به بقایای کربوهیدرات‌ها متصل می‌شوند، به همین دلیل

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۸۱۱-۸۲۷۶۲۹۵، فاکس: ۰۸۱۱-۸۲۷۶۲۹۹، ایمیل: hosseinipناه@hotmail.com

ماتریکس خارج سلولی به کار می‌روند [۲۳].

شروع رشد فولیکول، روند مداوم است که بعد از بلوغ در تخمدان با ترک فولیکول از حالت استراحت و ورود به مرحله رشد آغاز می‌شود؛ اعتقاد بر اینست که در این هنگام متکی به تحریک هورمونی نمی‌باشد [۱۹]. پس از آغاز مرحله رشد در فولیکول، غشاء پلاسمایی، اووسیت پستانداران را دربرمی‌گیرد که منطقه شفاف نامیده می‌شود و جهت دستیابی به لقاح، اسپرما توزوئید باید این پوشش خارج سلولی را تشخیص داده و به آن متصل شود. این غشاء، نسبتاً ضخیم بوده و حاوی ماتریکس خارج سلولی با میزان بالایی گلیکان است. این ماتریکس، نقش‌هایی چون محافظت از لقاح غیرگونه‌ای و چسبند اسپرمی در پستانداران بازی می‌کند [۸، ۱۱، ۲۰، ۲۱، ۲۲].

ساختمان و عمل پروتئین‌ها در منطقه شفاف به خوبی روشن شده است. منطقه شفاف از سه گلیکوپروتئین بزرگ تشکیل شده است که در طی اووژنز و احتمالاً بعد از اوولاسیون تعدیل می‌یابد. گوناگونی گلیکوپروتئین‌های تشکیل‌دهنده منطقه شفاف اووسیت پستانداران به دلیل این است که الیگوساکاریدهای آن از طرف زنجیره قندی‌شان به اکسیژن و نیتروژن متصل شده‌اند [۱۲].

پروتئین‌های منطقه شفاف گونه‌های مختلف پستانداران، به سه زیرگروه تقسیم می‌شوند که تحت عنوان ZP1، ZP2 و ZP3 خوانده می‌شوند و به ترتیب دارای وزن مولکولی ۲۰۰-۱۸۵، ۱۴۰-۱۲۰ و ۸۳ کیلودالتون می‌باشند. تحقیق حاضر با هدف مطالعه بقایای کربوهیدراتی قابل ارزیابی با لکتین‌های متصل به Horseradish Peroxidase (HRP) جهت اووسیت‌ها تا قبل از مرحله تخمک‌گذاری انجام شده است. دکوراسیون سطحی منطقه شفاف با هر دو شکل ان-استیل گالاکتوز و گلوکز برای بلوغ اووسیت قبل از تخمک‌گذاری ارایه شده است.

حیوانات مورد آزمایش. در این پژوهش، از موش‌های سفید (سوری) جوان نژاد N-MARI با سن ۸-۱۲ هفته و با وزن ۳۰-۲۵ گرم استفاده شد. این موش‌ها در سن پنج هفتگی از مؤسسه رازی تحویل و جهت عادت به محیط و برقراری شرایط معمول فیزیکی (گرما، سرما، رطوبت و نور) و تغذیه به حیوان‌خانه بخش علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل گردیدند و بعد از رسیدن به سن بلوغ با مشاهده تغییرات در نمای واژینال آنها [۱۴] و پس از اطمینان از آغاز سیکل جنسی، با قطع نخاع بلافاصله تخمدان‌های آنها خارج و در محلول فرمالین ۱۰٪ ثابت گردیدند.

در اینجا تعداد شصت عدد موش ماده مورد استفاده قرار گرفتند که در هر برش غالباً مقاطع مختلفی از فولیکول‌ها در طی چرخه تخمدانی، وجود داشت. مقاطع مختلف فولیکول‌ها به دسته‌های زیر تقسیم‌بندی گردید [۵، ۷، ۹، ۱۷]:

مرحله I، که تحت عنوان فولیکول‌های در حال استراحت (Resting follicles) نامیده می‌شود شامل: الف) فولیکول بدوی، هنگامی است که اووسیت‌ها توسط لایه‌ای از سلول‌های پهن فولیکولی دربرگرفته می‌شود.

ب) فولیکول بینابینی، اووسیت توسط مخلوطی از سلول‌های پهن و مکعبی احاطه شده است.

ج) فولیکول اولیه، هنگامی است که اووسیت، توسط سلول‌های مکعبی دربرگرفته می‌شود.

مرحله II، فولیکول ثانویه، که با افزایش ردیف‌های مختلف سلول‌های مکعبی فولیکول و ظهور فضایی در بین آنها مشخص می‌شود که شامل:

فولیکول Preantral، وقتی است که فضاها به صورت پراکنده در بین سلول‌ها ظاهر می‌شود.

فولیکول Antral، وقتی است که فضا ۱/۳ حجم فولیکول را دربرگیرد.

مرحله III، فولیکول ثالثیه، فولیکول انتخاب شده است و با فضایی بزرگتر از ۲/۳ حجم فولیکول می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نتایج

توزیع مناطق اتصال منطقه شفاف برای سه لکتین مورد استفاده با توجه به جدول ۱ و پس از تهیه جداول مربوط به هر رنگ آمیزی، اطلاعات آن کدگذاری گردید و توسط کامپیوتر به روش آنالیز واریانس یک طرفه غیرپارامتری کروسکال-والیس (Kruskal-Wallis) و با استفاده از برنامه SPSS آنالیز شد. تحلیل آماری توسط روش Mann-Whitney و با $P < 0/05$ ، اختلاف معنی داری را بین فولیکول‌ها نشان داد که نتایج مندرج در جدول ۲ به دست آمد [۱۸، ۱۶، ۱۳، ۴، ۳].

جدول ۱. درجه بندی شدت رنگ آمیزی

| تعریف | |
|------------------------|-----|
| هیچ رنگی ملاحظه نشد | - |
| شدت رنگ آمیزی بسیار کم | ± |
| شدت رنگ آمیزی کم | + |
| شدت رنگ آمیزی متوسط | ++ |
| شدت رنگ آمیزی زیاد | +++ |

جدول ۲. شدت رنگ آمیزی مراحل مختلف فولیکول‌ها توسط لکتین‌ها

| Lectins Follicles | DBA | PNA | WGA |
|-------------------|-----|-----|-----|
| Primordial | - | + | ++ |
| Intermediate | - | + | + |
| Primary | + | ++ | + |
| Secondary | ++ | +++ | ++ |
| Tertiary | +++ | +++ | ++ |
| Preovulatory | +++ | +++ | ++ |

لکتین WGA

نشانه‌های قندی جهت منطقه شفاف از مرحله اولیه تکامل فولیکول‌ها تا بلوغ آنها در شکل ۳ تقریباً با تراکم یکسانی در رنگ آمیزی با لکتین *Triticum vulgare* (WGA) دیده می‌شود.

مرحله IV، فولیکول Preovulatory، فولیکولی است که جهت تخمک‌گذاری آماده است.

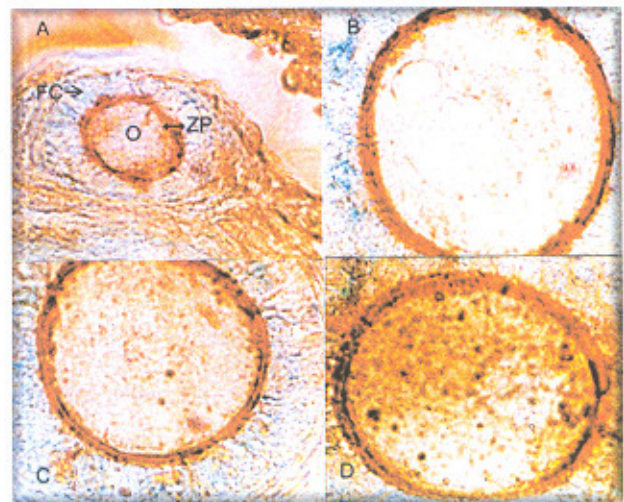
آماده‌سازی بافت و رنگ آمیزی. پس از ثابت شدن، تخمدان‌ها را از محلول فرمالین خارج نموده و پس از چند بار شستشو در آب مقطر؛ طبق روال معمول بافت‌شناسی قالب‌گیری گردیدند و سپس برش‌هایی به ضخامت سه میکرون تهیه شد و از هر مورد یک مقطع جهت بررسی نمای کلی با روش هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری بررسی گردید که این کار جهت سنجیدن کیفیت مقاطع و تأیید صحت تهیه مقطع صورت گرفت.

لکتین هیستوشیمی. لکتین‌هایی که از طریق هلال احمر جمهوری اسلامی ایران از شرکت سیگما خریداری شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. این لکتین‌ها تماماً با Horseradish peroxidase (HRP) متصل بودند و در بافر PBS حاوی ۰/۰۲ گرم کلرید منیزیم، ۰/۰۲ گرم کلرید منگنز، ۰/۰۵ گرم کلرید کلسیم و $pH=6/8$ رقیق شدند به طوری که غلظت لکتین در بافر، ده میکروگرم در میلی‌لیتر انتخاب شد. پس از آب دادن مقاطع به روش معمول بافت‌شناسی و حذف پیگمان کلرید برای خنثی کردن Endogenous peroxidase، به مدت پنج تا ده دقیقه در محلول ۰/۰۱ آب اکسیژنه در متانول قرار گرفتند. آن‌گاه مقاطع، به مدت یک ساعت در محلول بافر شستشو داده شده و به مدت دو ساعت در اتافک مرطوب در مجاورت لکتین‌ها قرار داده شدند. پس از شستشو در محلول بافر، مقاطع در محلول حاوی DAB و بافر به مدت ده دقیقه قرار گرفتند. محلول فوق با غلظت ۰/۰۳ گرم DAB در بافر بوده و آب اکسیژنه به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به ازاء هر میلی‌لیتر بافر به محلول اضافه شد. پس از خارج کردن مقاطع از محلول فوق، به مدت پنج تا ده دقیقه در آب جاری شستشو داده شدند؛ سپس به مدت پنج دقیقه در آلین بلو با $pH=2/5$ جهت رنگ زمینه قرار گرفتند. آن‌گاه بقیه مراحل آماده‌سازی کوپل‌ها با روش‌های معمول بافت‌شناسی انجام شد [۳، ۴].

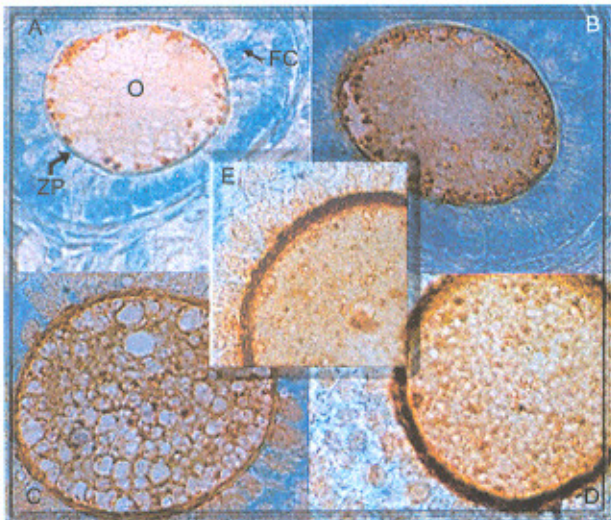
تخمک‌گذاری در مرحله IV وجود دارد.

لکتین DBA

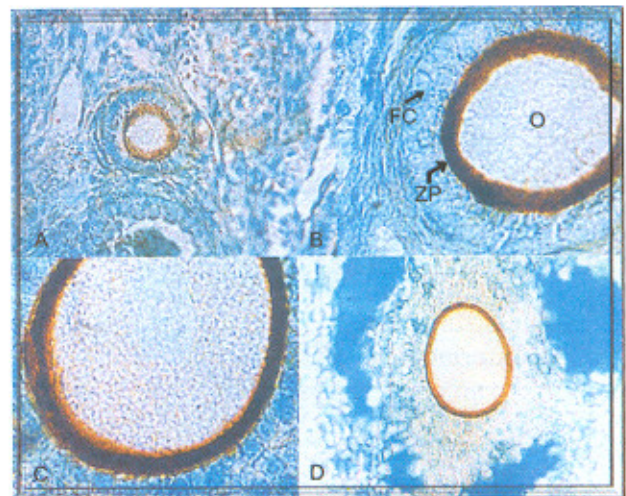
در تشخیص محل‌های اتصالی لکتین Dolichos biflorus (DBA)، اتصال ضعیفی در منطقه شفاف فولیکول در طی مراحل تکاملی از فولیکول‌های اولیه تا قبل از تشکیل فضا دیده می‌شود؛ اما در مراحل بعدی تکامل منطقه شفاف، پاسخ واضح مثبتی را نشان می‌دهد.



شکل ۱. عکس‌العمل لکتینی تکامل فولیکول توسط لکتین WGA نشان داده شده است. A) فولیکول بینابینی مرحله B) فولیکول Preantral مرحله C) فولیکول Antral مرحله D) فولیکول ثانیه مرحله III



شکل ۲. محل قرارگیری مناطق اتصالی لکتین DBA در طی بلوغ فولیکول، مشاهده می‌شود. A) فولیکول اولیه مرحله B) فولیکول Preantral مرحله C) فولیکول Antral مرحله D) فولیکول ثانیه مرحله E) فولیکول قبل از تخمک‌گذاری مرحله IV



شکل ۳. مراحل متوالی از تکامل فولیکول با به‌کاربردن لکتین PNA نشان داده می‌شود. A) فولیکول بینابینی مرحله B) فولیکول Preantral مرحله C) فولیکول ثانیه مرحله D) فولیکول قبل از تخمک‌گذاری مرحله IV

لکتین PNA

تراکم رنگ آمیزی با لکتین *Arachis hypogaea* (PNA) همراه بلوغ فولیکول‌ها افزایش می‌یابد. در این مشاهدات، افزایش اتصال پیشرونده‌ای از لکتین PNA در فولیکول بینابینی مرحله I تا فولیکول قبل از

بحث

منطقه شفاف، یک پوشش شفاف ضخیم و غیرسلولی است که غشاء پلاسمایی اووسیت پستانداران را در تمام مراحل رشد دربرمی‌گیرد. این ساختمان، گستره‌ای از اعمال مهم را در طی اووژنز، لقاح و تکامل پیش از لانه‌گزینی جنین بیان می‌دارد [۳]. مطالعات قبلی در مورد منطقه شفاف قویاً بیانگر این است که نوعاً این پوشش یک گلیکوکالیکس است [۴] که براساس چندین مطالعه رنگ آمیزی لکتینی مطرح می‌شود [۲، ۶] و

نتایجی از روند منفی به مثبت آن را در طی تکامل فولیکول، نشان می‌دهند که دال بر واکنش ترکیبات کربوهیدراته غشاء اووسیت موش بوده و در طی مسیر تکاملی، تغییرات محسوسی را نشان می‌دهد. لکتین PNA سبب تشخیص ان-استیل-بتا-دی-گلوکزآمین (BD-GlcNAc) و لکتین DBA مشخص‌کننده ان-استیل-آلفا-دی-گالاکتوزآمین (D-GalNAc) می‌باشد که دال بر اهمیت مشارکت شکل‌های ان-استیل گالاکتوز در طی تکوین ساختمان و عمل فولیکول به دنبال ارتباطات سلول به سلول می‌باشد [۱۵، ۱۰]. اخیراً نقش شایان توجهی را برای بقایای ان-استیل‌گالاکتوزآمین و نه گالاکتوز در طی اتصال اسپرم به غشاء اووسیت بیان کرده‌اند. در این رنگ‌آمیزی لکتینی، مراحل تکاملی موفق منطقه شفاف و اهمیت حضور بقایای ان-استیل‌گالاکتوز و گلوکز با نشانگرهای لکتینی مشخص در طی روند تکوینی، پیگیری و اثبات گردید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از حمایت مالی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و همکاری صمیمانه پرسنل آزمایشگاه هیستوشیمی گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد و آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان مباشر کاشانی دانشگاه علوم پزشکی همدان، به خصوص استاد گرامی جناب آقای دکتر محمود ستاری و آقای مهندس سیدمحمد امیرحسینی پناه اجرا شده است که بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از نامبردگان اعلام می‌دارد.

منابع

- [1] Benoff, S., Carbohydrates and fertilization, Mol. Hum. Reprod., 3 (1997) 599-637.

گزارشاتی مبنی بر مشارکت قندهای نشان‌دار شده با رادیواکتیو وجود دارد [۱۸].

بیان شده است که توزیع بقایای قندی در طی تکامل اووسیت متغیر است [۲]. در این روند، تغییرات سریع ساختمان کمپلکس کربوهیدراتی در طی تکامل جنینی [۲] و پاتولوژی [۱۸] برای دیگر بافت‌ها همانند اووسیت به اثبات رسیده و درگیری ساختمان‌های گلیکوکونژوگیت در ارتباطات سلول به سلول، مانند لقاح به‌طور گسترده‌ای تجزیه و تحلیل شده است [۱۳] و چندین مطالعه، دال بر نقش قطعی آنها در همراهی گلیکان‌ها در منطقه شفاف در ارتباط اسپرم و اووسیت وجود دارد [۱۳]؛ همچنین بعد از لقاح، روند اتصالی قندها در طی تکامل، تحت تشخیص تواتر اولیگوساکاریدها همراه با گلیکوکونژوگیت‌های منطقه شفاف می‌باشد. نتایج حاضر نشان می‌دهد که توزیع بقایای قندهایی که هدف لکتین‌های مربوطه هستند، بسیار جالب است و مسیر تغییرات بیوشیمیایی آنها نشانگر تعیین ساختمان‌های قندی در طول تکامل و بلوغ اووسیت می‌باشد.

سه نوع لکتین متصل به HRP، در مراحل مختلف تکامل فولیکول‌ها مورد استفاده قرار گرفتند؛ لکتین WGA قویاً اثبات‌کننده تمایل آن در تکامل اووسیت از مراحل اولیه تا انتهایی می‌باشد (شکل ۱). لکتین WGA رفتار اتصالی به منطقه شفاف را در برابر حضور بقایای ان-استیل-بتا-D-گلوکزآمین و اسید سیالیک در تمام طول مراحل تکاملی فولیکول دارد. در طی این مسیر شاهد حضور مؤثر بقایای ان-استیل‌گلوکزآمین در اتصال اسپرم با منطقه شفاف وجود دارد؛ همچنان‌که اووسیت حاوی لکتین اختصاصی GlcNAc، سبب عدم بروز عکس‌العمل‌های اتصالی به اسپرم می‌شود [۱].

اتصال لکتین در منطقه شفاف برای دو لکتینی که توانایی تشخیص ان-استیل‌گالاکتوز را دارند، وجود دارد. لکتین‌های DBA (شکل ۳) و PNA (شکل ۲)

- edition, London, Chirchill Livingstone, 2000, pp:1-45.
- [10] Legge, M. and Sellens, M.H., Mouse zygotes express endogenous lectins, *Mol. Reprod. Dev.*, 26 (1990) 308-312.
- [11] Liu, C., Litscher, E.S. and Mortillo, S., Targeted disruption of the mZP gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93 (1996) 4531-4536.
- [12] Loret demola, J.R., Garside, W.T. and Bucci, J., Age and hormonal environment affect the thickness of the human zona pellucida, *Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine*, 1996, s19.
- [13] Maymon, B.B., Maymon, R. and Ben-Nun, I., Distribution of carbohydrate in zona pellucida of human oocytes, *J. Reprod. Fertil.*, 102 (1994) 81-86.
- [14] Medialska, A., *Manipulating the mouse embryo*, Second Edition, London, Chirchill Livingstone, 1994, pp:245-309.
- [15] Miranda, P.V., Echererria, F.G., Briggiler, C.I.M., Brandelli, A., Blanquier, G.A. and Tezon, J.G., Glycosidic residues involved in human sperm-zona pellucida binding in vitro, *Mol. Hum. Reprod.*, 3 (1997) 399-404.
- [16] Ozgur, K., Patanka, M.S., Oehninger, S. and Clark, G.F., Direct evidence for the involvement of carbohydrate sequences in human sperm-zona pellucida binding, *Mol. Hum. Reprod.*, 4 (1998) 318-324.
- [2] Bleil, J.D. and Wassarman, P.M., Structure and function of the zona pellucida identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida, *Develop. Biol.*, 76 (1980) 185-202.
- [3] Fazel, A.R., Schulte, B.A., Thompson, R.P. and Spicer, S.S., Presence of a unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cells during migration, *Cell Differentiation*, 21 (1987) 199-211.
- [4] Fazel, A.R., Sumida, H., Schulte, B.A. and Thompson, R.P., Lectin histochemistry of the embryonic heart: Fructose specific lectin binding sites in developing rats & chicks, *Amer. J. Anat.*, 184 (1989) 76-84
- [5] Gougeon, A., Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypothesis, *Endocr. Rev.*, 17 (1996) 121-149.
- [6] Gwatkin, R.B.L. and Williams, D.T., Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after zona reaction, *J. Reprod. Fertil.*, 49 (1976) 55-58.
- [7] Junqueira, L.C., Carneiro, J. and Kelley, R.O., *Basic Histology*, Ninth edition, Stanford, Appleton & Lange, 1998, pp:421-445.
- [8] Keenan, J.A., Sacco, A.G. and Subramanian, M.G., Endocrine response in rabbits immunized with native versus deglycosylated porcine zona pellucida, *Biol. Reprod.*, 44 (1991) 150-156.
- [9] Larsen, W.J., *Human embryology*, Third

- [20] Wassarman, P.M., Role of carbohydrates in receptor-mediated fertilization in mammals, CIBA Foundation Symp., 145 (1989) 135-149.
- [21] Wassarman, P.M., Mouse gamete adhesion molecules, Biol. Reprod., 46 (1992) 186-191.
- [22] Wassarman, P.M., Zona pellucida glycoproteins, Ann. Rev. Biochem., 57 (1998) 415-442.
- [23] Weis, W.I., Structural basis of lectin-carbohydrate recognition, Annu. Rev. Biochem., 65 (1996) 441-473.
- [17] Sadler, T.W., Langman's medical embryology, 8th Edition, London, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp:3-48.
- [18] Shalgi, R., Maymon, R. and Bar-Shira, B., Distribution of lectin receptor sites in the zona pellucida of follicular and ovulated rat oocytes, Mol. Reprod. Dev., 29 (1991) 365-372.
- [19] Trounson, A. and Gardner, D.K., Handbook of in vitro fertilization, Second edition, USA, CRC Press LLC, 2000, pp:145-178.

Evaluation of lectin-binding sites in zona pellucida during ovarian cycle

S. M. Hosseinipناه* (Ph.D), M. Barbarestani (Ph.D), A. R. Fazel (Ph.D),
M. Habibirezai (Ph.D), M. Hosseini (Ph.D)

Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Introduction: Glycoconjugates, particularly their sugar side chains, play important roles in development. This investigation was undertaken to examine the chemical nature of components in the zona pellucida possibly related to follicular development.

Materials and Methods: To this end, lectins conjugated to horseradish peroxidase were used as specific histochemical probes to characterize the structure of zona pellucida glycoconjugates and changes in their composition during ovarian cycle.

Results: Three lectins for N-acetylation of galactose and glucose intensely stained the zona pellucida.

Conclusion: These observations suggest that the N-acetylgalactosamine (GalNAc) and N-Acetylglucosamine (GlcNAc)-containing glycoconjugates in zona pellucida may be of functional importance in follicular development. We can use this data for causing female infertility and to make special contraceptive.

Keywords: Glycoconjugate; Ovarian cycle; Zona pellucida; Lectin

* Corresponding author. E.mail: hosseinipناه@hotmail.com; Fax: 0811-8276299; Tel: 0811-8276295