فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال شانزدهم، شماره ۱، صفحه ۸ - ۱ (بهار ۱۳۹۲)

ISMJ 2013; 16(1): 1-8

# کلونینگ ژن PapG اشریشیاکلی یوروپاتوژن و بررسی تنوع توالی آن

فائزه حمیدیه [۱]، محمدحسن شیرازی [۲*]، جلیل فلاح مهرآبادی [۳]، محمدرضا پورمند [۲]، سمانه استادمحمدی [۱]، هدروشا ملااقامیرزائی [۱]، داود افشار [۲]

[۱] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه و پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی زنجان
[۲] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۳] گروه مهندسی ژنتیک، پژوهشکدهٔ علوم فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر تهران

(دریافت مقاله: ۹۰/۸/۲۹- پذیرش مقاله: ۹۰/۹/۵)

Archive of SID

## چکیده

**زمینه:** اشریشیاکلی یوروپاتوژن، پاتوژن غالب در عفونت‌های ادراری می‌باشد. عفونت‌های دستگاه ادراری، یکی از شایع‌ترین عفونت‌های انسانی می‌باشد. با وجود آنتی‌ژن‌ها و توکسین‌های مختلف باکتری‌های دخالت کننده در ایجاد عفونت، یکی از عوامل مهم در عفونت‌های ناشی از اشریشیاکلی و سایر باکتری‌های گرم منفی، چسبیدن باکتری به سطح سلول میزبان می‌باشد، بنابراین مهار اتصال باکتری، راهکاری مناسب جهت مهار عفونت می‌باشد. با توجه به‌اینکه، پروتئین PapG به‌عنوان ادهسین عمل می‌نماید، کاندیدی مناسب برای تهیه واکسن می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** DNA ژنومیک باکتری اشریشیاکلی سویه بالینی حاوی ژن *papG II*، استخراج گردید. با طراحی پرایمر برای ژن *papG II*، واکنش PCR انجام گرفت. محصول PCR در پلاسمید (pBluescript(-SK کلون گردید. با استفاده از نرم‌افزار ClustalW و MEGA4 توالی به‌دست آمده با توالی ژنی موجود در بانک ژن هم‌طراز گردید و تنوع ژنی آن بررسی گردید.

**یافته‌ها:** بر اساس این همطرازی، ناحیه N ترمینال در سطح پروتئین و DNA حفاظت شده می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** ناحیهٔ N ترمینال ژن PapG در بین سویه‌های بالینی یک توالی حفاظت‌شده است و می‌توان از آن برای طراحی واکسن علیه عفونت ادراری استفاده نمود

**واژگان کلیدی:** اشریشیاکلی یوروپاتوژن، پیلی‌تیپ P، ژن، کلونینگ

*تهران، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
E-mail: mhshirazi@tums.ac.ir

www.SID.ir

## مقدمه

اشریشیاکلی[1] جزء میکرو فلور طبیعی روده انسان و تمامی حیوانات خونگرم است. باکتری به‌عنوان عضو خانواده آنتروباکتریاسه، ویژگی‌های عمومی این خانواده را دارا می‌باشد. اشریشیاکلی فراوان‌ترین عامل عفونت‌های ادراری می‌باشد و بعد از باکتروئیدز دومین باکتری از لحاظ فراوانی در روده است (۱). اشریشیا کلی یوروپاتوژن، عامل اولیه عفونت مجاری ادراری می‌باشد که شامل سیستیت و پیلونفریت می‌باشند. اشریشیاکلی یوروپاتوژن گروهی از فاکتورهای ویرولانس را فعال می‌نماید که در نتیجه رشد باکتری را آسان می نماید وسبب مقاومت باکتری در داخل مجرای ادراری میزبان می‌گردد (۲ و ۳).

عفونت مجرای ادراری به کلونیزاسیون باکتری‌ها در سیستم ادراری و تهاجم به بافت‌های دستگاه ادراری اطلاق می‌گردد، تخمین زده می‌شود که حدود ۲۰ درصد از زنان در طول زندگی حداقل یک‌بار دچار عفونت مجاری ادراری می‌شوند و با افزایش سن این احتمال بیشتر نیز می‌شود. افزایش وقوع عفونت مجاری ادراری با افزایش سن برای هر دو جنس وجود دارد، اغلب عفونت‌ها در زنان کوتاه مدت بوده و اغلب منجر به آسیب کلیوی نمی‌شود، اما میزان وقوع عفونت مجاری ادراری در بین مردان جوان در همان گستره سنی بسیار کمتر است (۴).

اتصال مرحله ضروری در آغاز کلونیزاسیون سطوح مخاطی میزبان است و مقدمه عفونت تهاجمی محسوب می‌شود (۵).

اشریشیاکلی یوروپاتوژن انواع مختلف ادهسین[2] را مانند ادهسین‌های خانواده afa،Dr، پیلی P و پیلی S را بیان می‌کند که واسطه اتصال به گیرنده‌ها یا اپی‌توپ‌های گیرنده موجود روی یورواپیتلیوم هستند. یک گروه از فیمبریه‌های[3] مقاوم به مانوز، فیمبریه P است که توان اتصال به آنتی‌ژن‌های گروه خونی P انسان را دارد. به این فیمبریه Pap نیز گفته می‌شود که از اصطلاح پیلی همراه با پیلونفریت گرفته شده است. این پیلی‌ها متشکل از شش پروتئین ساختاری متمایز هستند و به حداقل دو محصول ژن اضافی برای تجمع نیاز دارند. پروتئین ساختاری اصلی PapA است که به‌غشای بیرونی به‌وسیله PapH متصل می‌شود، به انتهای دیستالش یک ساختار فیبریلیوم نازک متصل شده که تا حد زیادی از PapE ساخته شده و به میله به‌وسیله PapK متصل شده است. ادهسین PapG دورترین پروتئین در پیلی است و به فیبریلیوم به‌وسیله PapF متصل شده است، بنابراین PapG در نوک پیلی P است و مسئول چسبندگی می‌باشد، که عامل اتصال اشریشیاکلی یوروپاتوژن به سلول‌های یورواپی تلیال کلیه انسان می‌باشد و موجب پیلونفریت می‌شود (۶).

PapG به‌طول ۳۱۶ اسیدآمینه بوده و متشکل از یک قلمرو اتصالی گیرنده N ترمینال و یک قلمرو پیلین C ترمینال می‌باشد و در پیلی P به‌وسیله مسیر چاپرون/ آشر تجمع یافته و دارای سه آلل متفاوت papG III، papG II و papG I می‌باشد که به‌ترتیب به گلوبوتری آسیل سرآمید (Gbo3)[4]، گلوبوتترازیل سرآمید (Gbo4) و گلوبوپنتازیل سرآمید (Gbo5) موجود در غشا متصل می‌شوند. papGII غالباً با التهاب کلیه ولگنچه انسان و papG III با التهاب مثانه انسان همراه می‌باشد (۷).

Archive of SID
www.SID.ir

[1] Escherichia coli
[2] Adhesion
[3] Fimbriae
[4] Globo three acyle ceramid

بررسی‌ها نشان داده‌اند که پروتئین نوک‌پیلی (PapG) برای جذب باکتری به داخل سلول‌های اپیتلیال کلیه ضروری است (۸). یکی از راه‌های محدود کردن عفونت‌های حاد ادراری، تهیه واکسن علیه این عفونت‌ها است (۹). پروتئینی کاندید مناسب برای تهیه واکسن است که قدرت تحریک ایمونولوژی بالایی داشته باشد، در بین ایزوله‌های بیماری‌زا تنوع زیادی نداشته باشد و فاقد تغییر آنتی‌ژنتیکی و تشابه آنتی‌ژنی باشد. از آنجایی که این پروتئین به‌عنوان ادهسین عمل می‌نماید و واجد ویژگی‌های مذکور می‌باشد، برای تهیه واکسن کاندیدی مناسب است. این تحقیق با هدف کلونینگ ژن مورد نظر انجام شد تا در تحقیقات آتی از آن برای تهیه پروتئین نوترکیب PapG استفاده شود.

## مواد و روش‌ها

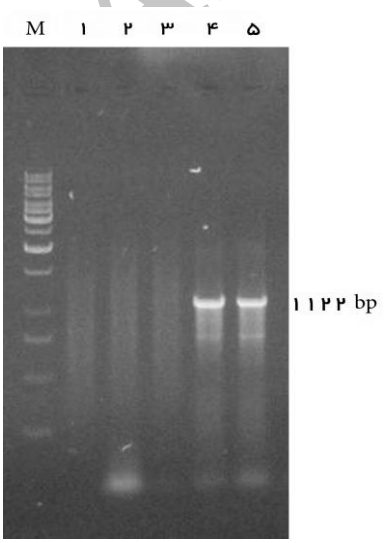
ابتدا باکتری اشریشیاکلی سویه بالینی حاوی ژن papG II در محیط LB براث کشت داده شد. محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۲۴–۱۸ ساعت گرماگذاری گردید. از باکتری‌های رشد یافته، DNA ژنومیک با استفاده از کیت (شرکت Bioneer، کره جنوبی) استخراج گردید. بر اساس توالی ژن مورد نظر یک جفت پرایمر طراحی گردید.

Forward:5'TTATGGCAATATCATGAGCAG 3'
Reverse:5'ATGAAAAAATGGCTCCCTGCT3'

ژن papG II با استفاده از فرآیند PCR ابتدا با آنزیم Taq DNA Polymerase و سپس با آنزیم Pfu DNA Polymerase تکثیر گردید. آنزیم Pfu DNA Polymerase دارای خاصیت reading proof بوده و در طی فرآیند PCR، از اشتباه کمتری برخوردار است. بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز صورت گرفت. در مرحله بعد وکتور (SK-) pBluescript با آنزیم EcoR V برش داده شد و اتصال ژن *papG II* به وکتور (SK-)pBluescript خطی توسط آنزیم T4 DNA Ligase صورت گرفت. پس از مستعدسازی وکتور نوترکیب به میزبان مناسب باکتریایی، E.coli DH5α ترانسفورم گردیده و روی پلیت آگار حاوی IPTG و X-gal پخش گردید. کلونی‌های سفید حاوی پلاسمید نوترکیب انتخاب و بعد از استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (شرکت Bioneer، کره جنوبی)، جهت تأیید نهایی توالی‌یابی شدند. با استفاده از نرم‌افزار ClustalW و MEGA4 توالی نوکلئوتیدی کلون (SK-)papG II /pBluescript با توالی‌های ژنی سویه‌های اشریشیا کلی حاوی ژن papGIIموجود در بانک ژن مقایسه گردید.

## یافته‌ها

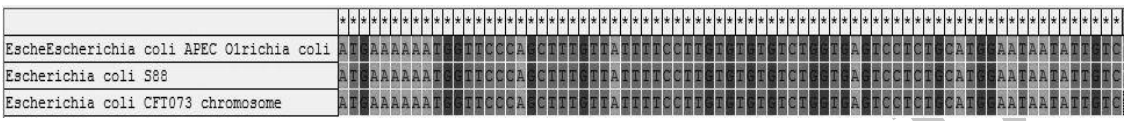
باکتری اشریشیا کلی از سویه بالینی حاوی ژن *pap*G *II* استخراج گردید. پس از طراحی پرایمر با توالی ذکر شده، واکنش PCR ابتدا با آنزیم Taq DNA Polymerase و در مرحله بعد با استفاده از آنزیم Polymeras Pfu DNA صورت گرفت (شکل ۱).



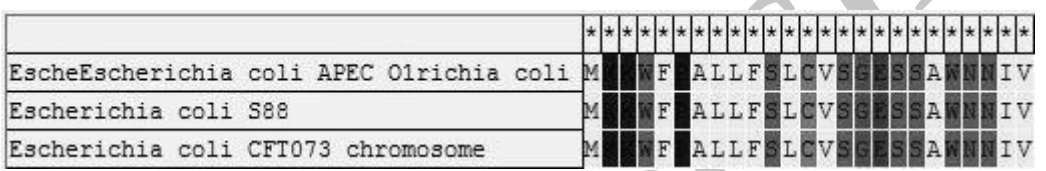

شکل ۱) نتیجه الکترو فورز محصول PCR با آنزیم DNA Polymerase *Pfu*

Archive of SID
www.SID.ir

محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد و در وکتور (pBluescript (-SK خطی شده با آنزیم EcoR V کلون گردید و به‌منظور صحت کلونینگ، توالی‌یابی انجام گردید. در ادامه با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 سویه‌های اشریشیا کلی واجد ژن *pap*GII موجود در بانک ژن در سطح پروتئینی و نوکلئوتیدی،Multiple Alignment شدند (شکل ۲ و ۳).




شکل ۲) Multiple Alignment نوکلئوتیدی توالی ژنی *pap*G II در سویه‌های اشریشیاکلی موجود در بانک ژن




شکل ۳) Multiple Alignment پروتئینی توالی ژنی *pap*G II در سویه‌های اشریشیا کلی موجود در بانک ژن

**جدول ۱) نتیجه Multiple Alignment توالی‌های ژنی *pap*G II در سویه‌های باکتریایی اشرشیا کلی دارای ژن *pap*G II موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA4**

| Point mutation | Accession number | سویه‌های باکتریایی اشریشیاکلی حاوی ژن *pap*G II |
|---|---|---|
| G 203 → A<br>T 206 → C<br>T 216 → C<br>A 277 → C<br>C 435 → T<br>C 478 → T<br>C 515 → A<br>A 565 → G<br>T 600 → C<br>G 858 → A | NC - 004431 | PapG protein [Escherichia coli CFT073] |
| C 218 → T | NC - 011742 | Fimbrial PapG protein (P pilus class II adhesin) (PapGII) [Escherichia coli S88] |
| _____ | NC – 008563 | allele II [Escherichia coli APEC O1] |

**جدول ۲) نتیجه Multiple Alignment توالی‌های پروتئینی *papG II* در سویه‌های باکتریایی اشرشیاکلی دارای ژن *papG II* موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA4**

| Point mutation | Accession number | سویه‌های باکتریایی اشریشیاکلی حاوی ژن |
|---|---|---|
| Gly (68) → Glu<br>Lys (93) → Gln<br>Thr (172) → Lys | NC - 004431 | PapG protein [Escherichia coli CFT073] |
| Ser (73) → Phe | NC - 011742 | Fimbrial PapG protein (P pilus class II adhesin) (PapGII) [Escherichia coli S88] |
| _____ | NC – 008563 | allele II [Escherichia coli APEC O1] |

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که در سویه‌های واجد ژنpapG II ناحیه N ترمینال در سطح پروتئین و DNAحفاظت شده بوده، ولی در ناحیه C ترمینال دارای اختلاف می‌باشد. در تحقیقات آینده جهت تهیه واکسن ناحیه N ترمینال، به‌دلیل محفوظ بودن پیشنهاد می‌گردد.

## بحث

اشریشیاکلی یوروپاتوژن (UPEC) باکتری غالب در ایجاد عفونت ادراری می‌باشند. عفونت مجاری ادراری (UTI)، یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در انسان محسوب می‌شوند، که تحت تأثیر جنسیت و سن قرار دارند (۱۰). پیلی در اشریشیاکلی یوروپاتوژن فاکتور ویرولانس مهمی برای باکتری می‌باشد، که همراه با سایر عوامل بیماری‌زایی مثل همولیزین و مقاومت سرمی عمل می‌کند. ثابت شده است که اولین مرحله در ایجاد عفونت، اتصال باکتری به بافت میزبان بوده و با توجه به تمایل بافتی، که در هر ارگانیسم نسبت به یک بافت خاص وجود دارد، به‌نظر می‌رسد که وجود این خصوصیت دلیلی بر اختصاصی بودن اتصال بین ارگانیسم و میزبان می‌باشد. یکی از راه‌های اتصال به‌خصوص در عفونت‌های ادراری، اتصال از طریق پیلی است. اتصال و در نتیجه کلونیزاسیون در باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژن، از طریق پیلی‌تیپ I وP انجام می‌گیرد. پیلی p می‌تواند عفونت بالارونده را باعث شده و موجب پیلونفریت شود (۱۱).

با توجه به مشکلاتی که این باکتری ایجاد می‌کند پژوهش‌هایی در زمینه تهیه واکسن جهت پیشگیری از بیماری‌های ناشی از این باکتری در انسان در حال انجام است (۱۲).

اسنونبرگ ادن (Svanborg-Eden) در مطالعات خود دریافت که وجود آنتی‌بادی‌های IgG و IgA ترشحی که از ادرار بیماران مبتلا به پیلونفریت حاد جدا می‌شود، از اتصال سویه‌های واجد پیلی به سلول‌های اپی‌تلیال مجرای ادراری ممانعت می‌کند. در این بررسی‌ها نشان داده شد که این آنتی‌بادی‌ها، از طریق جلوگیری از چسبندگی و اتصال پیلی به سطح سلول‌های مخاطی نقش محافظتی خود را در برابر عفونت ادراری ایفا می‌کنند (۱۳).

مطالعات انجام شده توسط گوتز (Goetz) و همکاران نشان داد که، ژن PapG اتصال باکتری یوروپاتوژن را تحریک می‌کند (۱۰).

در مطالعه دیگر توسط کروهنن (Korohonen) که با جداسازی ۴ فیمبریه P صورت گرفت نشان داده شد که، این موارد از نظر سرولوژیکی با یکدیگر واکنش متقاطع نشان می‌دهند (۱۵). استفاده از فیمبریه P به‌عنوان واکسن جهت پیشگیری از عفونت ادراری در حال توسعه است و وجود واکنش متقاطع حائز اهمیت است (۱۶).

فیمبریه P این خاصیت را دارد که می‌تواند عفونت بالارونده را سبب شده و باعث ایجاد پیلونفریت گردد. با توجه به مشکلاتی که این باکتری‌ها ایجاد می‌کنند، مطالعات بر روی تهیه واکسن جهت پیشگیری از بیماری‌های ناشی از این باکتری‌ها در انسان در حال انجام است. واکسن فیمبریه‌ای P می‌تواند شامل تمام پیکره‌ی باکتری غیرفعال، فیمبریه کامل تصفیه شده، پروتئین چسبنده رأس فیمبریه یا زیر واحدهای آنها و یا پپتیدهای ترکیبی همراه با پروتئین‌های حامل باشند. ادهسین گلوبوزید- PapG به‌عنوان یک ادجوانت در طول عفونت عمل می‌کند و مطالعات انجام شده نشان داد که، این فیمبریه ترشح SIgA را در ادرار افزایش داده و حتی افزایش ایمنی بر علیه LPS باکتری نیز

Archive of SID
www.SID.ir

نشان داده شده است (۱۷). وجود مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در بین سویه‌های مولد عفونت ادراری باعث شده که تلاش برای تولید واکسن جلوگیری کننده از عفونت ادراری حائز اهمیت باشد. تا کنون واکسن موفقی برای جلوگیری از عفونت ادراری شناسایی نشده است و عفونت‌های ادراری غالباً توسط آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شوند. استفاده از پیلی سطحی در باکتری‌ها به‌عنوان واکسن، موفقیتی در جلوگیری از طیف وسیع پاتوژن‌های ادراری حاصل نموده است (۱۷). به جهت اهمیتی که پیلی P و تیپ I به‌عنوان اعضای اصلی ادهسیو اشریشیاکلی یوروپاتوژن در بیماری‌زایی عفونت‌های ادراری دارند، استفاده از ادهسین FimH و PapG در ساخت واکسن‌های دو ظرفیتی در تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود (۱۱).

البته نکته قابل توجه در تهیه واکسن علیه عفونت ادراری این است که عامل بیماری بیش از یک گونه باکتریایی است و این محدودیتی است که کار تهیه واکسن را مشکل می‌سازد. به همین دلیل در این تحقیق از دو فاکتور بیماری‌زای شایع استفاده شده است.

**سپاس و قدردانی**

از همکاری‌های صمیمانه تمامی اساتید و دوستانی که در این تحقیق ما را یاری نمودند، سپاسگزاریم.

## References:

1.Kargar M, Daneshvar M, Homayoun M. Surveillance of Virulence Markers and Antibiotic Resistance of Shiga toxin Producing E.coli O157:H7 Strains from Meats Purchase in Shiraz. ISMJ 2011; 14: 76-83.
2.Salyers AA, Whitt DD, editors. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 2002: p. 150-84.
3.Welinder-Olssoni C, Kaijser B. Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC). Scand InfectDis 2005; 37: 405-16.
4.Johnson JR, Owens K, Gajewski A, et al. Bacterial characteristics in relation to clinical source of E.coli isolates from women withacute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. J Clin Microbiol 2005; 43: 6064-72.
5.Mulvey MA, Schiling JD, Martinez SJ, et al. Bad bugs and beleaguered bladders: Interplay between uropathogenic Escherichia coli and innate host defenses. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 8829-35.
6.Dodson KW, Pinkner JS, Rose T, et al Structural basis of the intraction of the pyelonephritic E.coli adhesion to its human kidney receptor. Cell 2001; 105: 733-43.
7.Wullt B. The role of P fimbriae for Escherichia coli establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. Int J Antimicrob Agents 2003; 21: 605-21.
8.Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and Virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. Exp Mol Pathol 2008; 85: 9-11.
9.Uehling DT, Hopkins WL, Elkahwaji JE, et al. Phase 2 clinical trial of a vaginal mucosal vaccine for urinary tract infections. J Urol 2003; 170: 867-9.
10.Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, et al. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infections. PloS Med 2007; 4: e329.
11.Emody L, Kerenyi M, Nagy G. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli. Int J Antimicrob Agents 2003; 22: 29-33.
12.Hacker J. Role of fimbrial adhesions in the pathogenesis of Escherichia coli infections. Can J Micro Biol 1992; 38: 720-7.
13.Svanborg-Eden C, Hansson HA. E.coli Pili as possible mediators of attachment to human UPEC. Infect Immun 1978; 21: 229-37.
14.Goetz GS, Mahmood A, Hultgren SJ, et al. Binding of pili from uropathogenic Escherichia coli to membranes secreted by human colonocytes and entrocytes. Infect Immun 1999; 67: 6161-3.
15.Bertin Y, Girardeau JP, Darfeuille-Michaud A, et al. Epidemiological study of pap genes among diarrheagenic or septicemic E.coli strain producing CS31A and F17 adhesins and characterization of Pap(31A) fimbriae. J clin Microbiol 2000; 38: 1502-9.
16.Soler E, Houdebine LM. Preparation of

Archive of SID
www.SID.ir

bladder infection in Primates. Dependence of the globoside-specific P-fimbrial tip adhesin and its cognate receptor. J Clin Invest 1997; 100: 364-72.

17.Soderhall M, Normark S, Ishikawa K, et al. Induction of protective immunity after E.coli Recombinant Vaccines. Biotechnol Annu Rev 2007; 13: 65-94.

Archive of SID

www.SID.ir

*Original Article*

# PapG Gene cloning, Escherichia coli uropathogen and examination of its subsequence diversity

*F. Hamidiyeh [1], MH. Shirazi [2*], J. Fallah Mehrabadi [3], MR. Pourmand [2], S. Ostad Mohammadi [1], H. Molla agha Mirzaei [1], D. Afshar [2]*

[1]*Department of Microbiology, School of Basic Sciences & Medicine, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, IRAN*
[2]*Department of Microbiology, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN*
[3]*Department of Genetic Engineering, Faculty of Biosciences and Biotechnology, Malekashtar University of Technology, Tehran, IRAN*

**(Received 5 Oct, 2011 Accepted 27 Nov, 2011)**

***Abstract***

**Background**: Escherichia coli uropathogen is dominant pathogen in urinary infections. Urinary tract infections are one of the most prevalent human infections. Despite different antigens and toxins of interfering bacteria in infection, one of the important agents in the infections arising from Escherichia coli and the other gram negative bacteria is bacterial binding to host cell surface, so inhibiting the bacterial binding is an appropriate strategy to inhibit the infection. Whereas PapG protein acts as adhesion, it can be an appropriate candidate for developingvaccine.

**Material and Methods**: A Genomic DNA of Escherichia coli bacterium extracted from clinical strain containing PapGII gene. Upon designing primer for *PapGII* gene, the PCR reaction was applied. The product of PCR was cloned in pBluescript (SK-) plasmid. Using Clustal W and MEGA4 software, the gained subsequence was alignmented with the gene subsequence existing in gene bank and its gene diversity was studied.

**Results**: Based on was down alignment, N terminal on the protein surface and DNA are protected.

**Conclusion:** N terminal domain of PapG gene is a conserved sequence among clinical straines? And it could be used for designing a vaccine against urinary tract infection.

**Keywords**: Escherichia coli uropathogens, type P pili, gene, cloning

Archive of SID

www.SID.ir

**Address for correspondence*: Department of Microbiology, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN; E-mail: shirzadeh@yahoo.com