Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
سال پانزدهم شماره ۴۶ فصل بهار سال ۱۳۸۴

اثر محافظتی سیتوکین SCF در مهار آپوپتوز ناشی از اشعه X در سلول‌های HL60

سیدجلال حسینی‌مهر (Ph.D.)* اسامو ایینانامی (Ph.D.)** میکینوری کووابارا (Ph.D.)**

چکیده

سابقه و هدف : آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول، فرایندی از خود کشی سلول است و پرتوهای یونیزان با صدمه به DNA سلول، موجب تحریک و سوق دادن آن به آپوپتوز می شوند. در تحقیق حاضر تاثیر اشعه X روی القاء آپوپتوز در سلول‌های لوکمی انسان (HL60) و همچنین مکانیسم اثر محافظتی سیتوکین SCF در مهار آپوپتوز ناشی از اشعه X مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها : سلول‌های HL60 در معرض ۵ گری اشعه X قرار گرفته و تاثیر زمان در افزایش درصد آپوپتوز در سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت و سپس گروهی از سلول‌ها یکساعت قبل از پرتوگیری سیتوکین SCF و همچنین گروه‌های دیگری از سلول همراه با SCF مهارکننده‌های مسیرهای داخل سلولی MAPK ، PI3K و PKC را دریافت کردند و سپس تغییر در روند آپوپتوز در سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها : نتایج نشان می‌دهد که اشعه X موجب القاء آپوپتوز در سلول‌ها می‌شود؛ به طوری‌که با افزایش زمان از ۱۲ تا ۶۰ ساعت بعد از پرتودهی به تدریج درصدآپوپتوز در سلول‌ها افزایش می‌یابد. انکوبه کردن سلول‌ها با SCF قبل از پرتو دهی موجب کاهش آپوپتوز می‌شود، این اثر کاهش آپوپتوز، توسط مهار کننده ERK سرکوب می‌گردد، در صورتی که مهار کننده های PKC و PI3K قادر به مهار مسیر داخل سلولی القاء شده توسط SCF نمی باشند.

استنتاج : نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که SCF با اثر تحریک فعال‌سازی پروتئین‌های مسیر MAPK موجب افزایش مقاومت و همچنین بقاء سلول در برابر عوارض سوء ناشی از اشعه X در سلول‌های HL60 می‌شود و سلول‌ها را در برابر اشعه با مکانیسم داخل سلولی و مرتبط با پروتئین‌های MAPK محافظت می کند.

واژه‌های کلیدی : آپوپتوز، سیتوکین، عامل پیش ساز سلول خونی، اشعه

مقدمه

درچند سال اخیر، محققین تلاش فراوانی در جهت کسب دانش مربوط به اهمیت عملکرد مرگ سلولی که به عنوان آپوپتوز (Apoptosis) یا مرگ برنامه ریزی شده سلول در پاسخ به اشعه می‌باشد را آغاز کرده‌اند؛

* متخصص داروسازی هسته ای ، استاد یار دانشکده داروسازی ساری ،دانشگاه علوم پزشکی مازندران ✉ ساری : خیابان سلمان فارسی= فلکه دوم= دانشکده داروسازی
** آزمایشگاه رادیوبیولوژی، دانشگاه هوکایدو، ژاپن

تاریخ دریافت : ۸۳/۵/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۳/۷/۴ تاریخ تصویب: ۸۳/۸/۱۳

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25]

www.SID.ir

Archive of SID

به طوری که پرتوهای یونیزان با صدمه به DNA سلول موجب مهار تکثیر و القاء آپوپتوز می‌شود(۱تا۳). آپوپتوز توسط سلول تنظیم می‌شود و از لحاظ ساختاری با تراکم کروماتین، کاهش حجم سلول و تورم غشاء و اجسام آپوپتوز شناسایی می شود که تحت شرایط فیزیولوژیکی در سلول‌های توموری و طبیعی در پاسخ به پرتوهای یونیزان، افزایش درجه حرارت، داروهای شیمی درمانی سرطان و عدم تعادل هورمون‌ها اتفاق می‌افتد(٤). پرتوگیری سلول‌ها به اشعه منجر به فعال شدن مسیرهای داخل سلولی می‌شود. این مسیرهای داخل سلولی عمدتا مرتبط با پروتئین کیناز می‌باشدکه پاسخ آن در ارتباط با مرگ سلول یا بقاء سلول می‌باشد. مسیرهای پاسخ محافظت سلولی مرتبط با (MAPK) [1] و (PI3 kinase) [2] می‌باشد که موجب فعال‌سازی و بیوسنتز پروتئین‌های مرتبط با بقاءسلول می‌شود. سیتوکین‌ها در تنظیم آپوپتوز از طریق فعال‌سازی پروتئین‌های مختلف مشارکت دارند (٥،٤).کمبود سیتوکین‌ها مانند عامل پیش‌ساز سلول خونی(SCF)[3]، عامل محرک کلنی ماکروفاژ(M-CSF)، عامل محرک کلنی گرانولوسیت (G-CSF) منجر به آپوپتوزیز می‌شود؛ به‌طوری‌کهSCF به گیرنده‌اش در سطح سلول متصل‌شده و موجب فعال‌سازی پروتئین‌های داخل سلولی موثر در القاء آپوپتوز می‌شود و بدین ترتیب روند القاء آپوپتوزیز کاهش پیدا می‌کند(٦). مسیر MAPK یکی از مسیرهای داخل سلولی است که در کاهش آپوپتوز موثر است؛ به طوری که فعال‌سازی این مسیر موجب تکثیر و بقاء سلول می‌شود(٧،٨).

SCF موجب تحریک رشد سلول‌های پیش‌ساز خونی و افزایش خون‌سازی همچنین بقاء سلول‌ها می‌شود؛ به طوری‌که تجویز SCF قبل از پرتودهی موجب محافظت سلول‌ها در برابر عوارض مرگ‌آور ناشی از اشعه می‌شود(٩). هر چند تاثیر SCF در فعال‌سازی مسیرهای داخلی سلول‌های پیش‌ساز خونی مشخص است(٨) ، مکانیسم اثر محافظتی SCF روی سلول‌های پرتو دیده، نامشخص است. لذا در این تحقیق تاثیر اشعه X روی القاء آپوپتوز در سلول‌های HL60 (Human Leukemia Cell Line) وهمچنین اثر محافظتی سیتوکین SCF در مهار آپوپتوز ناشی از اشعه X و مکانیسم اثر محافظت پرتوی SCF مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

کشت سلولی:

سلول‌های لوکمی انسان HL60 از RIKEN ژاپن تهیه شده است. محیط کشت RPMI 1640 (GIBCO/BRL) با اضافه کردن ۱۰/٤ گرم پودر RPMI 1640، پنی‌سیلین G پتاسیم (۱۰۰U به هر ml محیط‌کشت)، استرپتومایسین(۰/۱mg به هرمحیط‌کشت) و ۲ گرم سدیم بی‌کربنات در یک لیتر آب دو بار تقطیر تهیه شده است. PH محیط کشت با 1N HCl در ۷/٤ تنظیم شد. سپس محیط کشت را تحت شرایط سترون پالایش کرده و در شیشه‌های سربسته در یخچال برای انجام آزمایش‌ها نگه‌داری شدند. سلول‌های HL60 در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله در دمای $37^{0}C$ در ٥ درصد CO_2 رشدکرده‌است.

گروه های مورد آزمایش:

گروه‌های مورد تجربه عبارت بوده‌اند از: سلول‌های شاهد که دارو و اشعه دریافت نکرده بوده‌اند، سلول‌هایی

1. Mitogen-activated protein kinase
2. Phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase
3. Stem Cell Factor

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25]

Archive of SID

که فقط SCF دریافت کرده‌اند، سلول‌هایی که فقط اشعه دریافت کرده‌اند، سلول‌هایی که SCF و اشعه دریافت کرده‌اند، سلول‌هایی که SCF و اشعه و مهار کننده‌های مختلف دریافت کرده‌اند.

تیمار سلول‌ها با دارو و اشعه X:

پرتو دهی اشعه X با دستگاه X-ray Shimadzu HF-320 Kyoto, Japan, 20mA,) (200KVP, 2.0 mm Al filter در تندی دز ۳/۰۳ گری اشعه در درجه حرارت اتاق صورت گرفته است. برای بررسی آپوپتوز ناشی از اشعه X، سلول‌ها در محیط کشت حاوی SCF ۱۰۰ ng/ml (KIRIN Brewery ,Tokyo, Japan) ۲۵ μm، PD98059 (مهارکننده ERK) ، Wormanin ۱۰۰ μm (مهارکننده PKC) و GF109203 ۱۰۰ μm (مهار کننده PI3K) (Calbiocem ,La Jolla, Ca,USA) ، در دمای ۳۷° C و یک ساعت قبل از پرتودهی X-ray انکوبه شده‌اند(۹).

مشاهده سلول‌های آپوپتوتیک با میکروسکوپ فلورسانس:

سلول‌ها بعد از پرتودهی با اشعه X در زمان‌های مشخص(۱۲ تا ۶۰ ساعت) توسط سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰ rpm برای ۵ دقیقه در دمای ۴° C جمع‌آوری شدند. رسوب با بافر سالین- فسفات عاری از کلسیم و منیزیم ((PBS(-)) شست و شو داده و در محلول ۱ درصد گلوتارآلدهید تثبیت شده و سپس سلول‌های تثبیت شده با PBS(-) شسته و در آن سوسپانسیون شدند. به مقدار کمی از سوسپانسیون سلولی، PI (Sigma, Propidium Iodid) با غلظت ۴۰ μg/ml اضافه شده و سلول‌ها برای ۱۵ دقیقه در تاریکی رنگ‌آمیزی شدند. لایه‌ای از سلول‌ها روی لام تهیه شده و در زیر میکروسکوپ فلورسانس با مدل Olympus IX70 (Tokyo,Japan) بررسی شدند، سلول‌ها به رنگ قرمز جگری مشاهده شدند.

روش آماری:

میانگین درصد میزان آپوپتوز در گروه اشعه تنها و گروه SCF+ اشعه با آزمون آماری Student's t-test تحلیل شد. مقایسه میانگین درصد میزان آپوپتوز در گروه‌های مختلف مهارکننده با استفاده از ANOVA انجام پذیرفت. از Tukey's test به عنوان آزمون post Hoc استفاده شد. P.value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

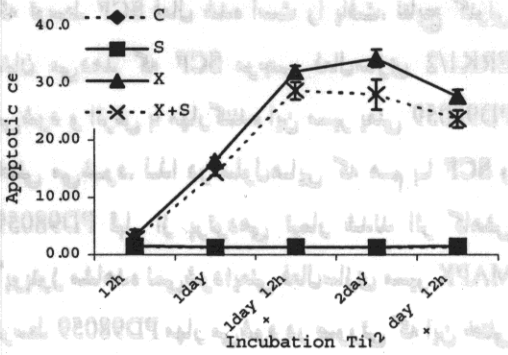
یافته‌ها

اثر SCF در مهار آپوپتوز ناشی از اشعه X در سلول‌های HL60:

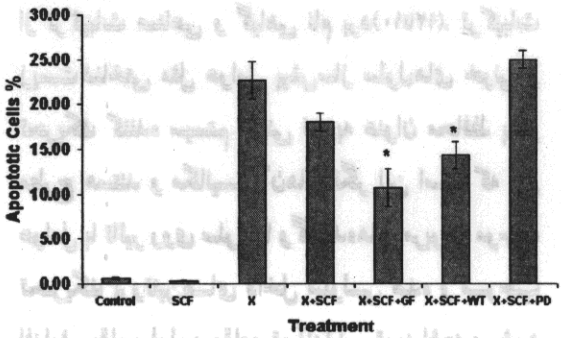
زمانی که سلول‌های HL60 در معرض ۵ گری اشعه X قرار گرفتند، تغییرات ساختاری که مشخصات بارز آپوپتوز هستند شامل متراکم شدن کروماتین و تکه تکه شدن هسته مشاهده شده است. تعداد سلول‌های آپوپتوز از ۱۲ ساعت تا ۴۸ ساعت بعد از پرتودهی به تدریج افزایش یافته است؛ به طوری که میزان درصد آپوپتوز از ۳/۳ درصد در گروه اشعه تنها در زمان ۱۲ ساعت انکوباسیون به ۳۴/۳ درصد در زمان ۴۸ ساعت افزایش یافته است که بیانگر تاثیر زمان بعد از پرتودهی در افزایش آپوپتوز است. انکوبه کردن سلول‌ها با SCF هیچ تاثیر سمی روی سلول‌های HL60 نداشته است. اضافه کردن SCF به محیط کشت سلولی یکساعت قبل از پرتودهی موجب کاهش درصد سلول‌های آپوپتوتیک شده است (نمودار شماره ۱)؛ به‌طوری‌که میزان آپوپتوز را از ۳۴ درصد در گروه اشعه به ۲۸ درصد در گروه اشعه+SCF کاهش یافته است و این کاهش از لحاظ آماری معنی دار بوده است ($p<0/05$).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25]
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره ۱: *روند افزایش سلول‌های آپوپتوز بعد از پرتودهی با اشعه X پس از انکوباسیون سلول‌های HL60 با SCF* . سلول‌ها یکساعت قبل از ۵ گری پرتودهی با اشعه X ، با SCF ۱۰۰ng/ml تیمار شدند. درهرشرایط آزمایش حداقل ۵۰۰ سلول شمارش شدند. نقاط رسم شده میانگین سه آزمایش هستند. تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های X+S وX در زمان‌های 1 day+12h و 2day و2day+12h مشاهده شده است($p<۰/۰۵$).C گروه شاهد، سلول‌هایی هستند که در محیط کشت رشد کرده و SCF اشعه ایکس دریافت نکرده‌اند. X کروهی از سلول‌ها هستند که فقط اشعه ایکس دریافت کردند، S سلول‌هایی هستند که فقط سیتوکین SCF دریافت کردند، X+SCF گروهی از سلول‌ها هستند که قبل از اشعه ایکس، سیتوکین SCF دریافت کرده‌اند.



نمودار شماره ۲: *تاثیر مهارکننده‌های MAPK، PI3K وPKC روی القاء یا مهار آپوپتوز در دو روز بعد از ۵ گری پرتو دهی با اشعه X* سلول‌ها با SCF ۱۰۰ng/ml ، GF109203 ۱۰۰nm ، Wortmanin ۱۰۰ nm (WT) و۲۵ µm PD98059 یکساعت قبل از پرتودهی تیمار شدند. تعداد سلول‌های آپوپتوتیک با رنگ‌آمیزی PI ارزیابی شدند. در هر آزمایش حداقل ۵۰۰ سلول شمارش شدند. داده‌ها بیانگر میانگین سه آزمایش است. تفاوت معنی‌داری بین گروه X+SCF+PD با X مشاهده نشده است ولی تفاوت بین گروه‌های X+SCF+WT و X+SCF+GF با X مشاهده شده است ($p<۰/۰۵$). اختصارات GF, WT, PD در قسمت مواد و روش‌ها توضیح داده شده است.

تاثیرSCF همراه با مهارکننده‌های MAPK,PI3K,PKC روی القاء آپوپتوز در سلول‌های HL60:

مهار کننده‌های ERK1/2،PI3K،PKC به سلول‌های HL60 در محیط کشت حاوی SCF ، اضافه شده است و دو روز بعد از پرتودهی سلول‌ها، درصد آپوپتوز در سلول‌های HL60 تعیین شده است. آپوپتوز در محیط کشت سلولی حاوی SCF ، GF109203 یا Wortmanin زمانی که یکساعت قبل از پرتودهی به سلول‌ها اضافه شود به ترتیب به میزان ٤٤ درصد و ۲۲ درصد کاهش پیدا می‌کند ($p<۰/۰۵$)، در صورتی که این اثر کاهنده در سلول‌های حاوی SCF و PD98059 مشاهده نمی‌شود(نمودار شماره ۲).

بحث

در بررسی حاضر اثر SCF در محافظت سلول‌های HL60 در برابر آپوپتوز ناشی از اشعه X بررسی شد. یافته مهم این پژوهش آن است که اگر SCF به محیط کشت سلول قبل از پرتو دهی با اشعه X اضافه شود موجب کاهش در صد آپوپتوز از طریق فعال‌سازی مسیر داخل سلولی MAPK می‌شود و مسیرهای دیگر داخل سلولی یعنی PKC و PI3K در این امر نقش کم‌تری دارند.

ترکیبات زیادی وجود دارند که وقتی قبل از پرتودهی تجویز شوند موجب کاهش اثر سوء اشعه روی سیستم زیست شناختی می‌شوند که آنها را به عنوان

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25]

www.SID.ir

Archive of SID

محافظ پرتو (Radioprotector) می‌شناسند که می‌توان از ترکیبات صناعی و گیاهی نام برد(۱۰تا۱۲). ترکیبات زیست‌شناختی مثل عوامل پیش‌ساز سلول‌های خونی و تحریک کننده سیستم ایمنی نیز به عنوان محافظ پرتو مطرح هستند و مکانیسم آن‌ها بیانگر این است که این عوامل با تاثیر روی سلول‌ها و گیرنده‌های مربوطه موجب تحریک پروتئین‌های داخل سلولی شده و موجب افزایش بقاء سلول و مقاومت آنها نسبت به اشعه می‌شود (۱۴،۱۳) به طوری که اینترلوکین-۵ با تاثیر روی پروتئین آنتی‌آپوپتوز Mcl-1 موجب مهار آپوپتوز می‌شود(۸).

نتایج حاضر نشان می‌دهد که سلول‌های لوکمی پیش‌ساز خونی انسانی (HL60) زمانی که تحت پرتودهی قرار گیرند به سوی آپوپتوز سوق پیدا می‌کنند که این منطبق با یافته های دیگر محققین برای انتخاب مناسب این نوع سلول‌ها برای بررسی آپوپتوز می‌باشد(۱۵،۷،۳). اشعه X آپوپتوز را به تدریج با افزایش زمان بعد از پرتوگیری ۵ گری اشعه X افزایش می‌دهد. SCF وقتی یک ساعت قبل از پرتودهی به کشت سلولی اضافه می‌شود موجب کاهش آپوپتوز در سلول‌های HL60 می‌شود. سیتوکین SCF یک‌عامل مهم درکاهش آپوپتوز و افزایش بقای سلول می‌باشد(۱۶). مسیرهای داخل سلولی MAPK و PKC و PI3 kinase وقتی فعال شوند موجب بیوسنتز پروتئین‌هایی می‌شوند که تکثیر و بقاء سلول را افزایش می‌دهند که این مسیرها به عنوان پاسخ‌های محافظت سلولی مطرح هستند(۴،۱). در مطالعه حاضر برای دستیابی به مکانیسم عمل SCF در مهار آپوپتوز ناشی از اشعه X از مهارکننده‌های اختصاصی مسیرهای داخل سلول MAPK ، PI3K و PKC استفاده شده است تا بتوان به طور اختصاصی مسیر داخل سلولی که توسط SCF فعال شده است را یافت. نتایج کنونی نشان می‌دهد که SCF موجب فعال‌سازی ERK1/2 می‌شود و اثرش با مهارکننده این مسیر یعنی PD98059 خنثی می‌شود. لذا در سلول‌هایی که هم با SCF و PD98059 قبل از پرتودهی تیمار شدند اثر کاهش آپوپتوز مشاهده نمی‌شود؛یعنی فعال‌سازی مسیر MAPK توسط PD98059 مهار می‌شود در صورتی که این خنثی شدن اثر SCF با مهارکننده‌های PKC و PI3K مشاهده نشد. ترکیباتی که موجب مهار ERK1/2 می‌شوند منجر به مهار فعال‌سازی MAPK شده و حساسیت پرتوی سلول‌های HL60 را افزایش می‌دهد و توانایی این سلول‌ها برای ترمیم در سیکل سلولی ناشی از اشعه را کاهش می دهد(۱۷،۸). پس مسیر داخل سلولی MAPK یک مسیر اساسی محافظت سلولی است که در پاسخ به عوامل مختلف فعال می‌شود. اگر چه آپوپتوز توسط مسیرهای مولکولی مختلف داخل سلولی توسط سیتوکین‌های مختلف تنظیم می‌شود(۸) ، در این مطالعه معلوم شد که SCF موجب بقا سلول با فعال‌سازی MAPK در سلول‌های پرتو دیده با اشعه X می‌شود و این مسیر داخل سلولی با اهمیت‌تر از مسیرهای PKC, PI3K است.

پس ترکیباتی که موجب فعال‌سازی ERK1/2 شوند، مرتبط با بقاء سلول، و ترکیباتی که آن را مهار می‌کنند موجب القاء آپوپتوز سلول می‌شوند. در نتیجه، SCF با تحریک فعال‌سازی پروتئین‌های مسیر MAPK موجب افزایش مقاومت و همچنین بقاء سلول در برابر عوارض سوء ناشی از اشعه X در سلول‌های HL60 می‌شود و سلول‌ها را دربرابر اشعه بامکانیسم داخل سلولی و مرتبط با پروتئین‌های MAPAK محافظت می‌کند.

فهرست منابع

1. Schmidt-Ullrich R, Dent P, Grant S. Signal transduction and cellular radiation responses. ***Radiation Res.*** 2000; 153: 245-257.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25]
www.SID.ir

Archive of SID

2. Langley R,Palayoor S, Norman C, Bump E.A. Modifiers of radiation-induced apoptosis. ***Radiation Res.*** 1993; 136: 320-326.

3. Witenberg B, Kletter Y, Kalir H, Fenig E. Ascorbic acid inhibits apoptosis induced by X irradiation in HL60 myeloid leukemia cells. ***Radiation Res.*** 1999; 152: 468-478.

4. Meyn R, Stephens L.C, Voehringer D.W. Biochemical modulation of radiation-induced apoptosis in murine lymphoma cells. ***Radiation Res.*** 1993; 136: 327-334.

5. Schimer A, Hedley D.W, Penn L. Receptor- and mitochondrial- mediated apoptosis in acute leukemia:a transduction view. ***Blood.*** 2001; 98: 3541-3553.

6. Dalmau S.R, Freitas C.S, Savina W. Radio-and chemoprotection of bone marrow cells by opposite cell cycle-acting cytokines. ***Leukemia Res.*** 1997; 21: 93-99.

7. Hopcia K.L, McCarey Y.L, Sylvester F.C. Radiation-induced apoptosis in HL60 cells: oxygen effect, relationship between apoptosis and loss of clonogenicity, and dependence of time to apoptosis on radiation dose. ***Radiation Res.*** 1996; 145: 315-323.

8. Huang H.M, Huang C.J, Yen J.J. Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis preventation activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. ***Blood.*** 2000; 96: 1764-1771.

9. Cui Y.D, Inanami O, Yamamori T, Niwa K, Nagahata H, Kuwabara M. FMLP-induced formation of F-actin in HL60 cells is dependent on PI3-K but not on intracellular Ca^{2+}, PKC, ERK or p38 MAPK. ***Inflamation Res.*** 2000; 49: 684-691.

10. Hosseinimehr S.J, Tavakoli H. Radioprotective effects of citrus extract against gamma irradiation in mouse bone marrow cell. ***J. Radiat. Res. (Tokyo).*** 2003; 44: 237-341.

11. Hosseinimehr S.J, Shafiee A. Radioprotective effects of 2-imino = 3{(chromone-2-yl)carbonyl} thiazolidine against gamma irradiation in mice. ***J. Radiat. Res. (Tokyo).*** 2002; 43: 292-300.

12. Hosseinimehr S.J,Shafiee A.Radioprotective effects of 2-iminothiazolidine derivatives against lethal dose of gamma radiation in mice. ***J. Radiat. Res. (Tokyo).*** 2001; 42: 401-408.

13. Maisin J.R. Bacq and Alexander award lecture, chemical radioprotection: past, present anf future prospects. ***Int. J. Radiat. Biol.*** 1998; 4: 443-450.

14. Patchen M.L, MacVittie T, Solberg B.D, Souza L.M. Survival enhancement and hemopoietic regeneration following radiation exposure: therapeutic aproach using glucan and granulocyte colony-stimulating factor. ***Exp. Hematol.*** 1990; 18:1042-1048.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-25]

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-0

15. Kam P.C.A, Ferch N.I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. ***Anesthesia.*** 2000; 55: 1081-1093.

16. Lotem J,Sachs L.Cytokines as suppressors of apoptosis. ***Apoptosis.*** 1999; 4: 187-196.

17. Lee Y, Soh J, Dean N.M. Protein kinase Cδ overexpression enhances radiation sensitivity via extracellular regulated protein kinase ½ activation abolishing the radiation-induced G2-M arrest. ***Cell Grow. Diff.*** 2002; 13: 237-246.

www.SID.ir