



اثر نانو ذرات اکسید تیتانیوم روی میزان سلول‌های خونی و آنزیم‌های کبدی موجود در خون رت نزاد ویستار

سعید رضایی زارچی

- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور یزد

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۳/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۴

چکیده

مقدمه: پیشرفت فناوری نانو و کاربردهای وسیع نانو ذرات در صنایع مختلف باعث شده است که بررسی اثرات مخرب نانو مواد بر روی موجودات اهمیت زیادی داشته باشد. امروزه از اکسید تیتانیوم در تولید انواع رنگ، لوازم آرایشی و بهداشتی، ساخت سرامیک، ساخت فتو کاتالیست‌ها، تصفیه آب و فاضلاب و بسیاری از موارد دیگر استفاده می‌شود. در این مطالعه اثر این ماده بر تعداد سلول‌های خونی و فعالیت آنزیم‌های کبدی رت مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: دوزهای ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذرات اکسید تیتانیوم با سایز ۲۵ نانومتر حل شده در آب مقطر به مدت ۱۴ روز بصورت دهانی به موش خورانده شد و بعد از این مدت از موش‌های صحرایی خون‌گیری بعمل آمد و تعدادی از فاکتورهای خونی اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد که نانو ذرات اکسید تیتانیوم طی چهارده روز تیمار موجب تغییراتی در سلول‌های خونی می‌گردد که در مورد بعضی از سلول‌های خونی مانند گلبول‌های سفید (لنفوسیت، مونوسیت، اوزینوفیل و بازووفیل) این تغییرات معنادار است. همچنین کاهش در تعداد گلبول‌های قرمز و افزایش در غلظت آنزیم‌های کبدی مشاهده گردید که نتایج حاکی از اثر سمیت نانو ذرات اکسید تیتانیوم بر بدن است.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش سمیت نانو ذرات اکسید تیتانیوم را تایید نمود و مطالعات بیشتر جهت پیش‌بینی اثرات این ماده پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات اکسید تیتانیوم، سمیت، سلول‌های خونی، آنزیم‌های کبدی

مقدمه

هريق از اين ويزگي ها پيش بیني مى شود نوع و ميزان اثر بيولوژيکي متفاوت باشد. همچنین عوامل ديگري از جمله نسبت سطح به حجم، انتقال فار، ثبات شيميايي و تمایل به تشكيل توده نيز ممکن است به همين اندازه اهميت داشته باشد.

بطور کلى با توجه به کاربردهای زياد نانو مواد در صنایع مختلف و وجود فرضيه های زيادي بر تاثيرات مخرب نانو ذرات بر روی موجودات زنده بررسی و پژوهش در اين زمينه از اهميت زيادي برخوردار است و هدف از اين پژوهش بررسی اثرات مخرب نانو ذرات اكسيد تيتانيوم با سايز ۲۵ نانومتر بر روی ميزان سلول های خونی و آنزيم های كبدی موجود در خون رت نزد و يستار است.

روش بررسی

در اين پژوهش تجربی از رت های بالغ نزد Wistar استفاده شد. ۴۰ رت نر (سن ۸ هفته و وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم) که در ۴ گروه ۱۰ تابی شامل یک گروه کنترل و سه گروه آزمایشی با دوز های ۵۰ (گروه ۱)، ۱۰۰ (گروه ۲) و ۵۰۰ (گروه ۳) میلی گرم بر کيلو گرم نانوذرات به ازاي وزن بدن مورد بررسی قرار گرفتند.

حيوانات مورد آزمایش از دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقي بزد مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری خریداري و در قفس های پرو پيلني موجود در لانه حيوانات گروه زیست شناسی که کف آنها از خاک اره پوشیده شده بود و در شرایط کنترل شده (درجه حرارت $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ، رطوبت حدود ۱۰٪، نور ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب) با دسترسی آسان به آب و غذای کامل (کنستانتره) نگهداری شدند.

تمام رت ها به مدت ۲ هفته قبل از شروع آزمایش ها در لانه حيوان ها در شرایط يكسان محطي نگهداري شدند، تا از نظر تطابق، آشنايي و رژيم غذايي به محيط عادت نمايند. تمامی آزمایشات حيوانی مورد تاييد كميته اخلاق بود.

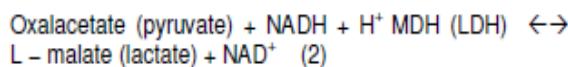
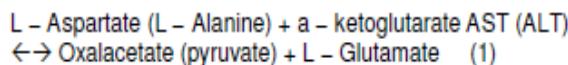
موش های هر گروه مورد به مدت ۱۴ روز به طور دهانی به وسیله گواز با دوز های (۵۰ mg/kg، ۱۰۰ و ۵۰۰) تغذيه شدند (۶).

با گذر از ميكروذرات به نانوذرات، با تغيير برخى از خواص فيزيكي رو برو مى شويم، که دو مورد مهم آنها عبارتند از: افزایش نسبت مساحت سطحي به حجم و ورود اندازه ذره به قلمرو اثرات كوانتمي (۱). افزایش نسبت مساحت سطحي به حجم که به تدریج با کاهش اندازه ذره رخ مى دهد، باعث غلبه يافتن رفتار اتم های واقع در سطح ذره به رفتار اتم های درونی مى شود. اين پديده بر خصوصيات فيزيكي و شيميايي ذره اثر مى گذارد (۱-۴). به محض آن که ذرات به اندازه کافي کوچک شوند، شروع به رفتار مکانيك كوانتمي و خواص جديد مى كنند (۴). نانو ذرات دى اكسيد تيتانيوم (TiO_2) به دليل ويزگي های منحصر به فرد آن مى تواند در توليد انواع رنگ، لوازم آرایشي و بهداشتی، ساخت سراميك، ساخت فتوکاتالیست ها، تصفیه آب و فاضلاب، فیلتراسیون گازها و بسیاری از صنایع دیگر کاربرد داشته باشد (۵). فرضيه های مطرح شده نسبت به آسيبهای احتمالي حاصل از فناوري نانو به طرز تهديد آميزی باعث کندی روند رشد و توسعه فناوري نانو خواهد شد. مگر آنکه اطلاعات صحيح، بی طرفانه و قانونمند در باره چيسىتى خطرها و چگونگي پرهيز از آنها منتشر شود (۶-۹).

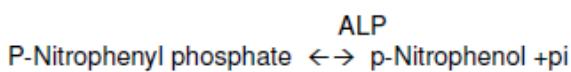
به منظور بر آورده کردن اين نيازها علم سم شناسی نانو مواد، نقش بسیار مهم در توسعه و گسترش نانو فناوري پايدار و ايمن خواهد داشت. اگر چه هم اکنون اطلاعات کمي در ارتباط با اثر سم شناسی زیست محيطی و اثر سم شناسی انسانی نانو مواد در دسترس است با اين وجود با توجه به ويزگي های فيزيكي- شيميايي نانو مواد پيش بیني مى شود که اين مواد با اجزاي زیستی برهم كنش داشته باشد و اثرات زیادي بر رفتار و خصوصيات ماکرومولکول، سلول و بدن موجود زنده به جای بگذارد (۱۰).

نانو مواد به دليل گوناگونی زياد در مقاييسه با ديگر مواد شيميايي معمول ويزگي های فراوان و بى نظيري دارند (۱۳-۱۱). ويزگي های فيزيكي (از جمله اندازه ذره، ريخت شناسی و حلاليت پذيری) و ويزگي های شيميايي (ترکيب و ساختار شيميايي نوع روکش نانو ذره) داراي اهميت هستند و با تغيير

Nicotinamide adenine (NADH) رفلکسی از کاهش dinucleotide در واکنش زیر است (۱۵):



فعالیت آلkalین فسفاتاز (ALP) با متد استاندارد شده توسط IFCC رفلکسی از تبدیل پ-نیتروفنیل فسفات به پ-نیتروفنل است که در فرمول زیر نشان داده شده است (۱۵):

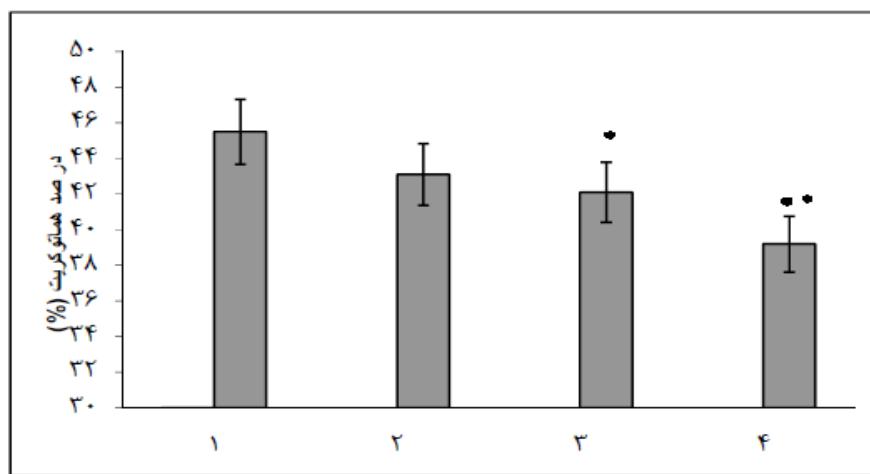


پس از جمع‌آوری داده‌ها آنالیزهای آماری با استفاده از نرمافزار SAS و همچنین تست‌های توکی دانت و t تست انجام گرفت. $P < 0.05$ معنی‌داری در نظر گرفته شد و نتایج بصورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ نمایش داده شد.

نتایج

یافته‌های مطالعه حاضر مبنی بر مصرف نانو ذرات اکسید تیتانیوم خوراکی توسط موش‌های نژاد ویستار نشان می‌دهد که میانگین تعداد گلوبول‌های سفید در گروه‌های آزمایشی ۲ افزایش یافته ولی در گروه آزمایشی ۳ و ۴ با افزایش دوز کاهش یافته است (نمودار ۱). همچنین مشاهده شد در گروه ۴ این کاهش معنادار می‌باشد ($p < 0.05$).

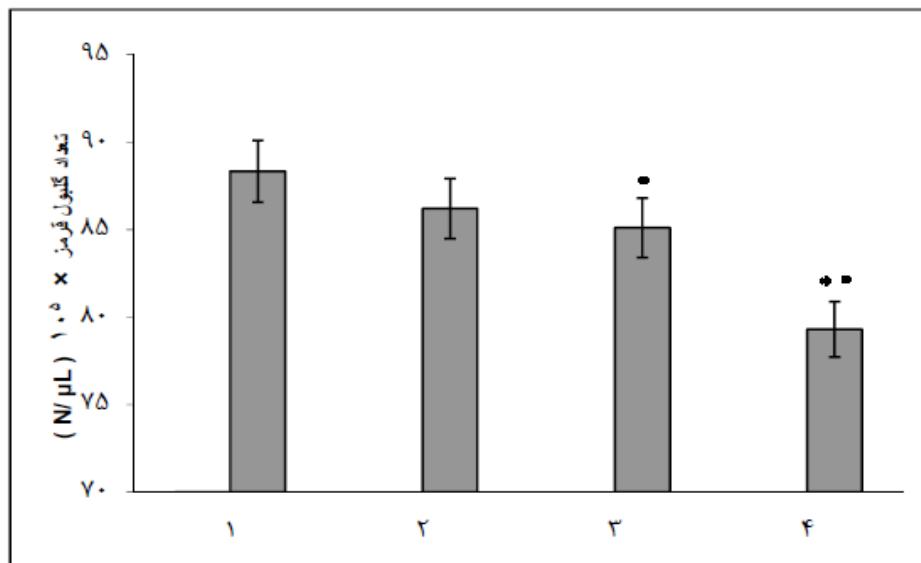
جهت تهیه دوزهای مورد نظر، نانو ذره اکسید تیتانیوم با سایز ۲۵ نانومتر از شرکت نوتربینو (تهران، ایران) خریداری و در آب مقطر تحت امواج فرماصوت به مدت ۱۵ دقیق حل گردید. با قطع قسمت انتهایی دم به وسیله تیغ بیستوری، با پیپت هماتوکریت، ملانژور سفید و قرمز خون لازم برداشت گردید. پیپت هماتوکریت در سانتریفوژ هماتوکریت قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس با خط ویژه دستگاه میزان هماتوکریت اندازه‌گیری و ثبت گردید. ملانژورهای سفید و قرمز به ترتیب با محلول‌های مارکانو و هایم به اندازه لازم رقیق و سپس به وسیله دستگاه شیکر کاملاً مخلوط گردید و سپس با استفاده از لام نفوبار و میکروسکوپ نوری گلوبول‌های سفید و قرمز شمارش و تعداد آن محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری آنزیم‌های Alanine Aspartate aminotransferase (AST) و Alkaline phosphatase (ALP) aminotransferease (ALT) مقداری از خون گرفته شده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شده تا سرم از لخته جدا شود. بعد از جداسازی سرم خون از لخته به وسیله سمپلر، نمونه‌ها تا زمان انجام سنجش‌های آنزیمی در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد منجمد و نگهداری شدند. سپس با استفاده از کیت‌های آنزیمی شرکت Zymo Research Corporation آمریکا و به روش توصیه شده International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) شد (۱۴). در اندازه‌گیری فعالیت AST و ALT، فعالیت دو



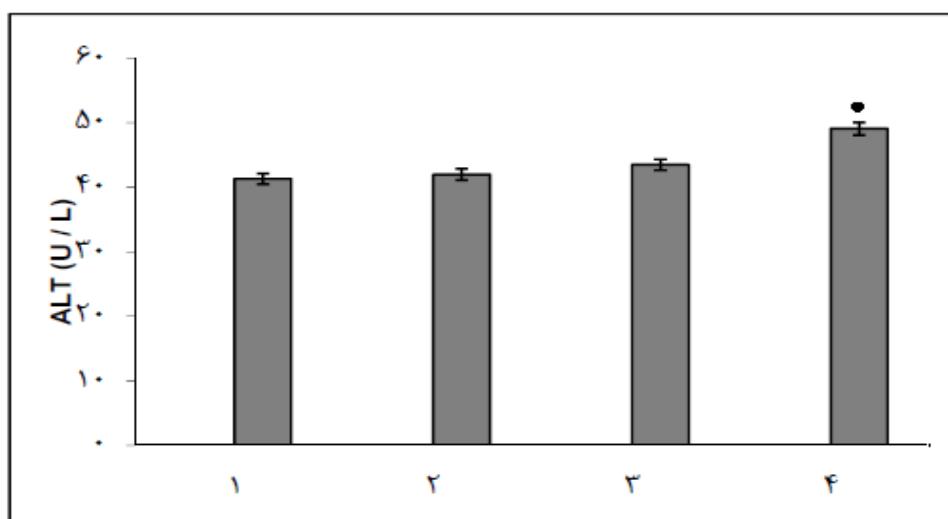
نمودار ۱: مقایسه میانگین تعداد گلوبول‌های سفید در گروه‌های ۱: کنترل و آزمایشی با دوزهای ۲، ۵۰، ۱۰۰:۳ و ۴: ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، تغییرات در گروه آزمایشی ۴ معنی‌دار است ($p < 0.05$).

آزمایشی سوم و چهارم دریافت کننده نانو ذرات از نظر آماری با گروه کنترل معنادار است (نمودار ۲ و ۳).

بررسی نتایج نشان داد در تمام گروههای آزمایشی کاهشی کلی در میانگین درصد هماتوکریت و میانگین تعداد گلبولهای قرمز دیده می‌شود. این کاهش در مقایسه با کنترل در گروه



نمودار ۲: مقایسه میانگین درصد هماتوکریت در گروههای ۱: کنترل و آزمایشی با دوزهای ۲، ۵۰، ۱۰۰، ۳ و ۴: ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، کاهش درصد هماتوکریت در گروههای آزمایشی ۳ ($p < 0.05$) و ۴ ($p < 0.01$) نسبت به کنترل معنی دار است.



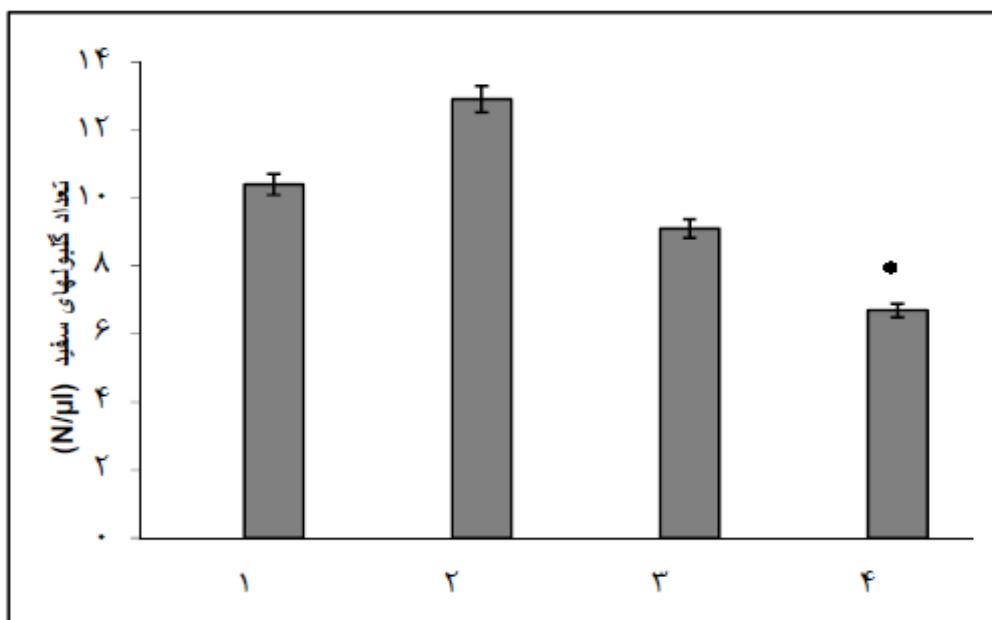
نمودار ۳: مقایسه میانگین تعداد گلبول قرمز در گروههای ۱: کنترل و آزمایشی با دوزهای ۲، ۵۰، ۱۰۰، ۳ و ۴: ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، کاهش تعداد گلبول قرمز در گروههای آزمایشی ۳ آزمایشی ۴ ($p < 0.05$) و ۴ ($p < 0.01$) نسبت به کنترل معنادار است.

در گروه دریافت کننده بالاترین غلظت نانو ذرات از نظر آماری معنادار است ($p < 0.05$) (نمودار ۴).

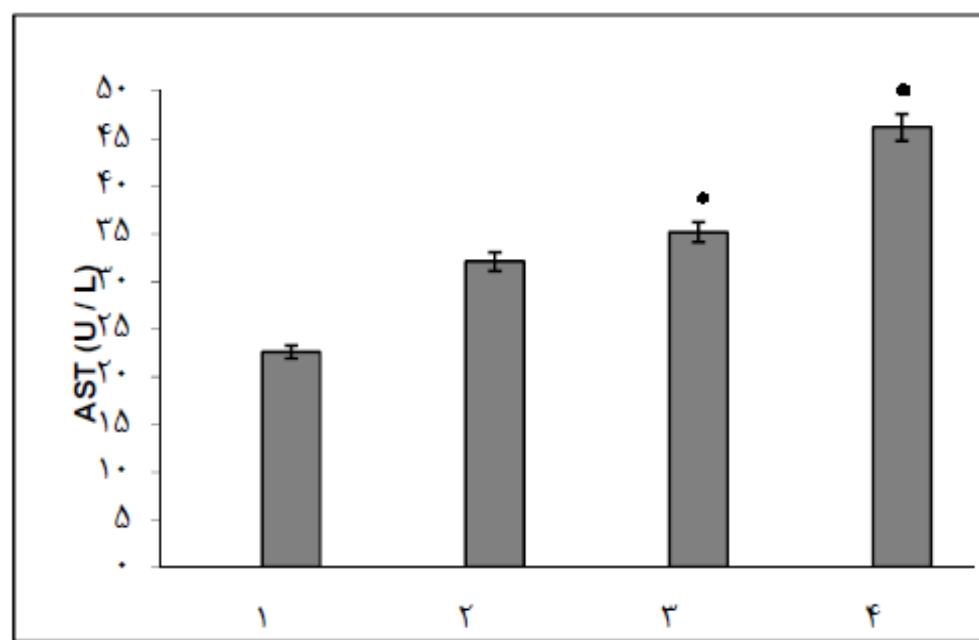
نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم ALT در گروههای آزمایشی افزایش یافته که این افزایش در مقایسه با کنترل تنها

افزایش در مقایسه با کنترل در گروههای ۳ و ۴ دریافت کننده نانو ذرات از نظر آماری معنادار است($p < 0.05$) (نمودار ۵).

یافته های این مطالعه حاکی از این بود که میزان فعالیت آنزیم AST در تمام گروههای آزمایشی افزایش یافته که این آنزیم



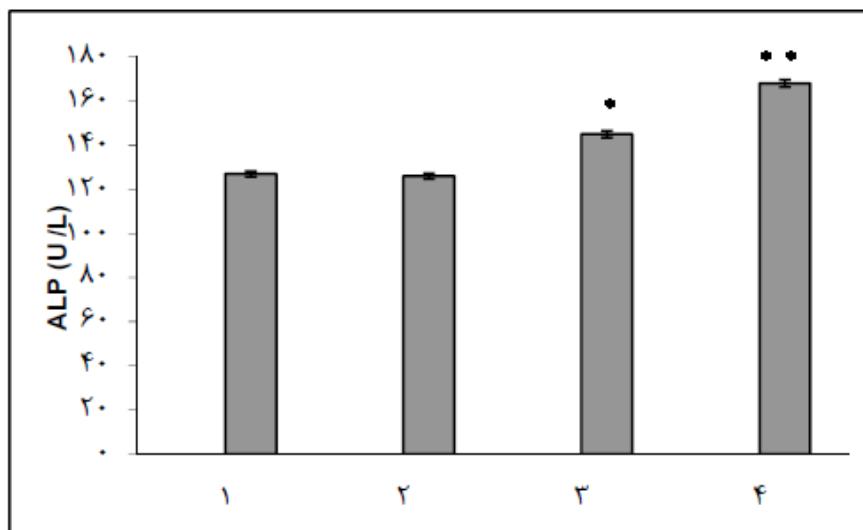
نمودار ۴: مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم ALT در گروههای ۱: کنترل و آزمایشی با دوزهای ۲: ۵۰، ۳: ۱۰۰ و ۴: ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، افزایش میزان فعالیت آنزیم LT در گروه آزمایشی ۴ نسبت به کنترل معنادار است($p < 0.05$).



نمودار ۵: مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم ST در گروههای ۱: کنترل و آزمایشی با دوزهای ۲: ۵۰، ۳: ۱۰۰ و ۴: ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، افزایش میزان فعالیت آنزیم ST در گروههای ۳ و ۴ آزمایشی نسبت به کنترل معنادار است($p < 0.05$).

کنترل در گروه‌های دریافت کننده نانو ذرات از نظر آماری معنادار است (نمودار ۶).

نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم ALP در گروه‌های آزمایشی ۳ و ۴ افزایش یافته که این افزایش در مقایسه با



نمودار ۶: مقایسه میانگین میزان فعالیت آنژیم ALP در گروه های ۱: کنترل و آزمایشی با دوزهای ۲، ۵۰، ۱۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، افزایش میزان فعالیت آنژیم ALP در گروه های آزمایشی $p < 0.05$ و $p < 0.01$ نسبت به کنترل معنادار است.

بحث و نتیجه گیری

آلودگی‌های ناشی از نانو ذرات امروزه بعنوان مسائلهای جدید و خطرناک مطرح شده است (۱۰-۸). ماندگاری نانو ذرات اکسید فلزی در محیط و زنجیره غذایی زیاد می‌باشد، که موجب تداوم مسمومیت‌های ناشی از آنها می‌شود (۱۶). در پژوهش حاضر اثر سمیت نانو ذرات اکسید تیتانیوم به علت کاربرد زیاد آن در صنایع مختلف بررسی شده است.

اندازه‌گیری تعداد گلوبول‌های سفید در غلظت‌های کم نشان دهنده افزایش گلوبول‌های سفید بود که بیان می‌دارد در ابتدا بدن در جهت مقابله با این ذرات ورودی تولید گلوبول‌های سفید را افزایش می‌دهد ولی با تضعیف بدن در غلظت‌های بالا کاهش تولید گلوبول‌های سفید مواجه هستیم.

به نظر می‌آید نانو ذره اکسید تیتانیوم فرآیندهای مختلفی را در بدن تحت تاثیر قرار می‌دهد(۱۷). پیش‌بینی می‌شود نانو ذرات با افزایش التهاب غدد لنفاوی، درگیری سلول‌ها در واکنش‌های التهابی را بیشتر کرده و به موازات آن باعث افزایش انتقال لنفوسيت‌های مرحله G1 به مرحله S تقسیم سلولی

سیتوپلاسم سلول وابسته به ویژگی‌های نانو ذره خواهد بود. اگر نانو ذره در سیتوپلاسم مستقر شود حضور برخی مواد درشت دانه می‌تواند باعث ایجاد آسیب مستقیم یا مرگ سلول در اثر این تعاملات شود(۸).

در این مطالعه جهت بررسی اثر سمیت نانو مواد بر روی کبد از بین آنزیم‌های متعدد کبدی سه آنژیم ALT، AST و ALP برای بررسی کارکرد کبد مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. که در غلظت بالای نانو ذرات اکسید تیتانیوم با افزایش غلظت این سه آنژیم در خون مواجه بودیم. دو آنژیم ALT و AST در داخل سلول و آنژیم آلکالن فسفاتاز (ALP) در غشاء سلول وجود دارند. در اثر از بین رفتن سلول کبدی این آنژیم‌ها در خون رها می‌شوند. بنابراین بالا رفتن این آنژیم‌ها نشانه‌ای از تخریب سلول‌های کبدی است. دو آنژیم اول (ALT-AST) بیشتر نشان دهنده وضعیت سلول‌های کبدی و آلکالن فسفاتاز بیشتر نشان دهنده عملکرد و آسیب مجاری صفوایی به خصوص مجاری خارج کبدی است(۲۱، ۲۰). بطور کلی نتایج این پژوهش سمیت نانو ذرات اکسید تیتانیوم را تایید نمود و مطالعات بیشتر جهت پیش‌بینی اثرات این ماده پیشنهاد می‌گردد.

می‌دهد. التهاب ایجاد شده در غدد لنفاوی نیز به افزایش تعداد سلول‌های سفید کمک می‌کند، ولی با گذشت زمان فعالیت این غدد ضعیف شده و غدد لنفاوی دچار آتروفی می‌شوند که جبران ناپذیر خواهد بود. در نتیجه در مسمومیت‌های شدید کاهش تعداد سلول‌ها ظاهر می‌گردد. گزارش شده است نانو ذرات همراه با فعالیت زیاد احتمالاً در بافت‌های هدف نفوذ می‌کنند و سبب عملکرد نامطلوب اندام‌ها می‌شوند. نانوذرات می‌توانند به اعمق بافت‌ها نفوذ کنند و به سیستم لنفاوی راه یابند(۱۰).

گزارش شده است ذراتی که پوشش ضخیم دارند از جذب فاگوسیت‌های موجود در گره‌های لنفاوی می‌گریزند و به جریان لنف وارد می‌شوند اما اگر میزان پوشش‌دهی کامل نباشد چنین ذراتی در گره‌های لنفاوی انباسته می‌شوند(۱۰).

شناخت مکانیسم خاص نانوذرات و نحوه اندرکنش آن نیازمند تحقیقات بسیار گستره‌های در این زمینه است. هنگامی که نانو ذرات در یک بافت انباسته شوند ممکن است به درون سلول‌ها جذب شوند و یا اینکه جذبی صورت نگیرد. اگر این ذرات جذب شوند جایگزینی نهایی مورد سلولی در لیزوژوم یا

منابع:

- 1- Erb U, Aust KT, Palumbo G. *In nanostructured materials. processing, properties and potential applications.* Noyes: New York; 2002.p. 179-222.
- 2- Goddard WA, Brenner DW, Lyshevski SE, Iafrate GJ. *Handbook of nanoscience, engineering, and technology.* CRC: Boca Raton; 2002.
- 3- Mulvaney P. *In nanoscale materials in chemistry.* Wiley: New York; 2001.p. 121-68.
- 4- Alivisatos AP. *Semiconductor clusters, nanocrystals and quantum dots.* Science 1996; 271(5251): 933-9.
- 5- Mital GS, Manoj T. *A review of TiO₂ nanoparticles.* Chinese Sci Bull 2011; 56(16): 1639-57.
- 6- Chen Z, Meng H, Xing G, Chen C, Zhao Y, Jia G, et al. *Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo.* Toxicology Letters 2006; 163(2): 109-20.
- 7- Aillon KL, Xiea Y, El-Gendy N, Berkland CJ, Forresta ML. *Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity.* Adv Drug Deliv Rev 2009; 61(6): 457-66.

- 8- Shi JW, Zhang F, Zhao YL, Chai ZF. *Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice.* Toxicology Letters 2006; 161(2): 115-23.
- 9- Zhang XD, Wu HY, Wu D, Wang YY, Chang JH, Zhai ZB, et al. *Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes.* Int J Nanomedicine 2010; 5: 771-81.
- 10- Revell PA. *The biological effects of nanoparticles.* Nanotechnology Perceptions 2006; 2: 283-98.
- 11- O'Grady K. *Biomedical applications of magnetic nanoparticles.* J Phys D: Appl Phys 2002; 36(13): 24-32.
- 12- Begum NS, Ahmed HMF. *Synthesis of nanocrystalline TiO₂ thin films by liquid phase deposition technique and its application for photocatalytic degradation studies.* Bull Mater Sci 2008; 31(1): 43-8.
- 13- Mahshid S, Ghamsari MS, Askari M, Afshar N, Lahuti S. *Synthesis of TiO₂ nanoparticles by hydrolysis and peptization of titanium isopropoxide solution.* Semicond Phys Quantum Electron Optoelectron 2006; 9(2): 65-8.
- 14- IFCC/AACC. *Standard method for ALP.* Clin Chim 1983; 79: 751-60.
- 15- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F. *IFCC Primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37C.* Clin Chem Lab Med 2007; 40(7): 725-33.
- 16- Peter HH, Irene BH, Oleg VS. *Nanoparticles-known and unknown health risks.* J Nanobiothechnol 2004; 2(1): 12-27.
- 17- Meei W, Tsung W, Luan H. *Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan.* Environ Hroy Peal Perspect 2001; 109(10): 1011-17.
- 18- Steven H, Lamm MD. *Health effects of arsenic.* Fundam Appl Toxicol 2001; 3: 309-14.
- 19- Silva AM, Novelli EL, Fascineli ML, Almeida JA. *Impact of an environmentally realistic intake of water contaminants and superoxide formation on tissues of rats.* Environ Poll 1999; 105(2): 243-9.
- 20- Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. *Sleisenger and fordtran's Gastrointestinal and Liver disease.* Philadelphia: Saunders; 2002.
- 21- Okechukwu O, Segun O. *A comparative analysis of six current histological classification schemes and scoring systems used in chronic hepatitis reporting.* Rev Espatol 2004; 37(3): 269-77.

Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles on The Amount of Blood Cells and Liver Enzymes in Wistar Rats

Rezaei Zarchi R(PhD)

Department of Biology, Payame Noor University, Yazd, Iran

Received: 25 Dec 2010

Accepted: 9 Jan 2011

Abstract

Introduction: Considering the development of nanotechnology and extensive use of nano-materials are in different fields of industry, it is necessary to investigate their destructive effects on biological systems. Titanium dioxide(TiO_2) is used in the production of different dyes, cosmetics, ceramics, photocatalysts, water and sewage treatment and a lot of other products. In the present study, the effect of TiO_2 on the number of blood cells and the activity of liver enzymes of rat was assessed.

Methods: Concentrations of 50, 100 and 500 mg/Kg TiO_2 nanoparticles (25 nm size) in distilled water were administered orally to Wistar rats for 14 days and some blood factors were studied on the blood samples collected.

Results: Results showed that TiO_2 nanoparticles cause different changes in blood cells, and the changes were significant for some of them such as white blood cells (lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils). Decreased number of red blood cells and increased level of liver enzymes was also observed after the administration of different concentrations of TiO_2 , which proves the toxic effects of TiO_2 on the body.

Conclusion: Results of the present study proved the toxicity of TiO_2 nanoparticles on the living organisms. So, further studies are recommended to predict TiO_2 toxicity.

Keywords: Nanoparticles; Titanium; Liver/enzymology; Blood Cell Count; Rats, Wistar

This paper should be cited as:

Rezaei Zarchi R. *Effect of Titanium dioxide nanoparticles on the amount of blood cells and liver enzymes in the wistar rats.* J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 19(5): 618-26.

*Corresponding author: Tel:+ 98 352 3674659, Email: srezaei@ibb.ut.ac.ir