



## بررسی اثر محلول متیلن بلو در از بین بردن پروتو اسکولکس های کیست هیداتیک در

### شرایط آزمایشگاهی

خسرو حضرتی تپه<sup>۱\*</sup>، سید جواد موسوی<sup>۲</sup>، افشین برازش<sup>۳</sup>، الماس اسدی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۲</sup> گروه جراحی، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۳</sup> گروه میکروب شناسی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

<sup>۴</sup> دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

### چکیده

زمینه: در حال حاضر درمان انتخابی کیست هیداتیک جراحی می باشد. با توجه به خطر ریخته شدن محتویات کیست به داخل اعضای شکم و انتشار اسکولکس ها حین خارج سازی، جهت پیشگیری، مواد اسکولکس کش مختلفی به داخل کیست تزریق می شود که عوارض جانبی گوناگونی در بدن میزبان دارند. لذا در این تحقیق تأثیر اسکولکس کشی متیلن بلو بر روی کیست هیداتیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: جهت انجام مطالعه، تعداد ۵۰ کبد آلوده گوسفند که حاوی حداقل یک کیست بارور با پروتواسکولکس های زنده بودند، جمع آوری گردید. زنده بودن پروتواسکولکس ها از طریق حرکت سلول های شعله شمعی و تکان های محتویات داخلی آنها و در نهایت رنگ آمیزی ائوزین تأیید شد و در سه گروه به ترتیب تحت تأثیر سالین هیپرتونیک اشباع، نرمال سالین و متیلن بلو به عنوان کنترل های مثبت، منفی و تست قرار گرفتند. پروتواسکولکس ها در زمان های ۲، ۴، ۸ و ۱۶ دقیقه از نظر زنده بودن در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

یافته ها: متیلن بلو و سالین نرمال در فواصل زمانی مذکور هیچ گونه تأثیری بر اسکولکس ها نداشتند و صد درصد پروتواسکولکس ها تا پایان ۱۶ دقیقه زنده بودند، ولی سالین هیپرتونیک اشباع در زمان های ۲ و ۴ دقیقه، حدود ۹۵ درصد و ۸ و ۱۶ دقیقه، ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس ها را از بین برد.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده حاکی از عدم تأثیر این ماده بر روی پروتواسکولکس ها بود و لذا پیشنهاد می شود مطالعات و تحقیقات بیشتر در زمینه دستیابی به یک ماده اسکولکس کش مؤثر و بدون عوارض برای انسان ادامه یابد.

واژگان کلیدی: متیلن بلو، پروتواسکولکس، کیست هیداتیک، شرایط آزمایشگاهی، اکتینوکوکوس گرانولوزوس

دریافت مقاله: ۸۸/۲/۲۱- پذیرش مقاله: ۸۸/۳/۱۸

\* ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو پردیس نازلو، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

## مقدمه

در حفره پری سیست یا بافت‌های مجاور باقی مانده، و ایجاد کیست‌های جدید را بنمایند (۹) و یا عوارضی مانند کلانژیست و تنگی مجاری صفرا به همراه داشته باشند (۱۰)، طوری که در یک مطالعه میزان عود کیست‌های هیداتیک بعد از اعمال جراحی، حدود ۱۳ درصد گزارش شده است (۱۱). جراحان برای جلوگیری از عود یا کاهش احتمال آن، هنگام برداشت کیست در اتاق عمل، مواد اسکولکس‌کشی را به داخل کیست هیداتیک تزریق می‌کنند.

تاکنون اسکولکس‌کش‌های زیادی بکار گرفته شده‌اند. موادی چون فرمالین ۲ درصد، سرم نمکی هیپرتونیک ۳۰-۲۰ درصد، الکل ۹۶ درصد، محلول ستریماید اسکولیساید، نیتراست نقره و بتادین را می‌توان به این منظور نام برد (۱۲). هر کدام از این مواد دارای معایب و محاسنی هستند که کاربرد آنها را محدود می‌نماید. فرمالین اولین و رایج‌ترین ماده مورد استفاده بود. علی‌رغم اثر بخشی مؤثر آن به علت سمی بودن دیگر استفاده نمی‌شود، چون هنگام تزریق به درون کیست‌های هیداتیک کبیدی، امکان دارد از طریق راه‌های ارتباطی که بین حفره کیست و مجاری صفراوی وجود دارد وارد این مجاری شده و بنابه ماهیت سوزاننده خود، بالقوه به اپی‌تلیوم داخل مجاری، آسیب وارد ساخته و باعث ایجاد فیبروز و تنگی مجاری گردد (۱۳). سرم نمکی هیپرتونیک ۳۰-۲۰ درصد به عنوان مواد اسکولکس‌کش در اتاق‌های عمل بخش‌های جراحی از گذشته تا به امروز مورد استفاده قرار می‌گیرد. دلیل استفاده از این ماده به این خاطر است که باعث ایجاد خاصیت اسموزی قوی در جداره پروتواسکولکس‌ها شده و در نهایت موجب متلاشی شدن آنها می‌شود. ولی عیب آن این است که غلظت

هیداتیدوزیس یا اکینوкокوزیس بیماری انگلی ناشی از ابتلاء به مرحله لاروی (کیست هیداتیک) انگل اکینوкокوس گرانولوزوس می‌باشد (۱ و ۲). این بیماری از جمله بیماری‌های مشترک بین انسان و دام با انتشار جهانی بوده که سالانه خسارات اقتصادی و بهداشتی سنگینی به کشورهای مختلف جهان از جمله ایران وارد می‌سازد (۳). در یک مطالعه مروری، وضعیت آلودگی کیست هیداتیک در ایران در طی یک دوره بیست ساله، از سال ۱۳۶۴ تا ۱۳۸۴، جمع‌بندی شده و نتایج در سه محور گزارشات موردی، اعمال جراحی انجام شده در بیمارستان‌ها و مطالعات سرولوژی گزارش گردیده است. تعداد گزارشات موردی از بیماری هیداتیدوزیس در بافت‌های غیر معمول بدن انسان، ۴۵ مورد بوده و میزان تقریبی آلودگی در کشور، ۴/۸ عمل جراحی در صد هزار جمعیت در سال برآورد شده است. همچنین این مطالعه، میانگین آلودگی بر اساس گردآوری نتایج سرولوژی انجام شده در این مدت بیست ساله را حدود ۴/۴۲ درصد اعلام نموده است (۴).

پاره شدن کیست‌های هیداتیک بارور در بدن معمولاً منجر به تشکیل کیست‌های ثانویه در اعضای دیگر شده و اغلب به شوک آنافیلاکسی و مرگ منجر می‌شود (۵). با توجه به خطرات بیماری و عدم وجود دارویی موثر، در حال حاضر بهترین راه درمان این بیماری جراحی است (۶ و ۷)، اما شرایط جسمانی خاص و یا وجود ضایعات متعدد در اعضا مختلف برخی بیماران، باعث محدودیت این نوع درمان در افراد مذکور می‌گردد (۸). هنگام خارج نمودن و تخلیه کیست توسط جراح، امکان دارد که مقداری از پروتواسکولکس‌های زنده در اثر نشت مایع داخل آن،

با و بدون رنگ‌آمیزی با ائوزین به عنوان معیار برای تعیین مرگ اسکولکس‌ها استفاده گردید. روش اول، بر مبنای مشاهده حرکت سلول‌های شعله شمعی و حرکت و تکان‌های محتویات داخلی پروتواسکولکس‌ها در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی  $10\times$  و در روش دوم که با استفاده از رنگ‌آمیزی پروتواسکولکس‌ها با ائوزین بود، هر پروتواسکولکسی که رنگ ائوزین را جذب کرد، مرده در نظر گرفته شد.

تعداد پروتواسکولکس‌ها به میزان هزار پروتواسکولکس در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید و در سه گروه از لوله‌های آزمایش ریخته شد. به لوله‌های گروه اول، سرم فیزیولوژی (کنترل منفی)، لوله‌های گروه دوم نمک هیپرتونیک اشباع (کنترل مثبت) و گروه سوم محلول متیلن‌بلو pH برابر با ۷ و غلظت ۰/۳ درصد (۱۸) اضافه گردید. از تمامی لوله‌های آزمایش و گروه‌های کنترل در طی زمان‌های ۲ و ۴ و ۸ و ۱۶ دقیقه اسمیر مستقیم تهیه و در میدان‌های مختلف میکروسکوپی با بزرگنمایی  $10\times$  تعداد پروتواسکولکس‌ها شمارش شده و از نظر زنده بودن به صورت درصد مشخص می‌شدند. از دست دادن شکل بیضوی و تغییر شکل گرد پروتواسکولکس‌ها، جمع شدن روستلوم‌ها و گرفتن رنگ ائوزین به منزله مرده بودن آنها در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

همان‌طور که در جدول ۱ آمده است، در فاصله زمانی ۴ و ۲ دقیقه در گروه کنترل مثبت تحت اثر با سالین هیپرتونیک اشباع، ۹۵ درصد پروتواسکولکس‌ها از بین رفتند و در گروه کنترل منفی تحت اثر با سرم فیزیولوژی، ۱۰۰ درصد آنها زنده ماندند و بالاخره در گروه مورد مطالعه، محلول متیلن‌بلو هیچ‌گونه تأثیری بر اسکولکس‌ها مشاهده نشد (جدول ۱).

آن در ۳۰ درصد باقی نمی‌ماند و در نتیجه حل شدن در مایع هیداتیک، رقیق و کم و یا بی‌اثر می‌شود. از طرفی هم اگر غلظت در این حد باقی بماند، نسوج سالم اطراف را تخریب می‌کند (۱۴). در مورد ماده بتادین، عدم تأثیر آن به عنوان یک ماده ضد اسکولکس به اثبات رسیده است (۱۵).

در این مطالعه اثر متیلن‌بلو به عنوان یک اسکولکس‌کش مورد آزمایش قرار گرفته است. متیلن‌بلو علاوه بر اینکه عوارض جانبی سویی ندارد، از نظر ارزان بودن و قابل دسترس بودن و همچنین رنگی بودن آن، جراح می‌تواند انتشار آن را در نقاط مختلف بدن در حین عمل جراحی، به سادگی بررسی نماید (۱۶).

### مواد و روش کار

این مطالعه برای بار اول در سال ۱۳۸۰ به صورت تجربه اولیه و به طور کامل در سال ۱۳۸۵ انجام گردید. جهت انجام تحقیق، ابتدا در دفعات متعدد به کشتارگاه صنعتی ارومیه مراجعه و تعداد ۵۰ کبک گوسفند آلوده به کیست هیداتیک شناسایی و جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه انتقال داده شدند. کیست‌ها از نظر بارور و غیر بارور بودن مورد بررسی قرار گرفته و مایع کیست‌های بارور آسپیره شد و در لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید.

لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه جهت ته‌نشین شدن سر لاروها ثابت نگه داشته شدند، سپس بخش رویی لوله‌ها با پیپت پاستور تخلیه و مایع ته‌نشین شده از نظر تعداد و درصد زنده بودن پروتواسکولکس‌ها بررسی شد. از آن جایی که فعالیت سلول‌های شعله شمعی قبل از جذب رنگ از بین می‌رود (۱۷)، به همین دلیل از دو روش مشاهده با میکروسکوپ نوری

جدول ۱) مقایسه میانگین اثر پروتواسکولکس کشی متیلن بلو با نمک هیپرتونیک اشباع و نرمال سالین زمان ۲ و ۴ دقیقه

اسکولکس کش	تعداد		تعداد	میانگین تعداد		CI* % 95
	اسکولکس کشته شده پس از ۲ دقیقه	اسکولکس کشته شده پس از ۴ دقیقه	اسکولکس کشته شده	اسکولکس کشته شده	SD (انحراف معیار)	
متیلن بلو	۰	۰	۰	۰	۰	۰
نمک هیپرتونیک اشباع	۹۰	۱۰۰	۹۵	۹۵	۱۵/۵۵	۲/۱۹
نرمال سالین	۰	۰	۰	۰	۲/۱۹	۰

Candidacy Interval\*

فرمالین ۱۰ دقیقه می‌باشد (۱۹). این ماده بر روی کیست‌های دختر حتی بعد از گذشت ۴ روز اثری ندارد و در گزارش پژوهشگران آمده است که موجب اسکروز مجاری صفراوی و یا حتی مرگ به علت مسمومیت می‌شود (۲۰). از سرم نمکی هیپرتونیک ۳۰-۲۰ درصد سال‌ها در ایران استفاده شده و نتایج رضایت بخشی داشته است و علت اینکه برخی از این محلول استفاده نمی‌کنند این است که غلظت آن در حد ۳۰ درصد باقی نمی‌ماند و در نتیجه حل شدن در مایع هیداتیک، رقیق و کم و یا بی‌اثر می‌شود و اگر هم غلظتش در این حد باقی بماند، به نسوج سالم اطراف ضایعه، آسیب می‌رساند (۲۱). از طرفی این ماده به عنوان یک ماده اسکولکس کش در غلظت‌های مختلف از ۰/۹ تا ۳۰ درصد و با زمان‌های مختلف از یک تا ۶۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفته است، فقط اعلام نکرده‌اند که در غلظت‌های مشخص چند درصد از پروتواسکولکس‌ها و در چه زمانی زنده هستند (۱۷).

الکل ۹۶ درصد و آب اکسیژنه ۱۲ حجم را نیز به عنوان اسکولکس کش بکار می‌برند (۲۲ و ۲۳). داروی دیگر مورد استفاده برای این منظور، محلول نیم درصد نیترا ت نقره با اثر کشنده بر روی اسکولکس‌ها می‌باشد. این محلول باید تازه و با آب مقطر تهیه و مصرف شود (۲۴). مواردی از مرگ متعاقب مصرف

اثر اسکولکس کشی متیلن بلو و سالین هیپرتونیک اشباع و سرم فیزیولوژی در فواصل زمانی ۸ و ۱۶ دقیقه هم مورد بررسی قرار گرفت که در طی این مدت، همچنان متیلن بلو بدون اثر، سالین هیپرتونیک ۱۰۰ درصد پروتواسکولکس‌ها را از بین برد و سالین نرمال هیچ‌گونه اثری روی پروتواسکولکس‌ها نداشت.

### بحث

هنگام خارج‌سازی و تخلیه کیست هیداتیک توسط جراح، در صورت نشت مایع آن در بافت‌های اطراف، احتمال ایجاد کیست‌های جدید و عود بیماری وجود دارد (۹). بنابراین برای جلوگیری از این امر و یا کاهش احتمال آن، هنگام برداشت کیست در اتاق عمل، مواد اسکولکس کش توسط جراح به داخل کیست هیداتیک تزریق می‌شود. تاکنون مواد زیادی به عنوان اسکولکس کش به کار گرفته شده‌اند (۱۲). برخی از این مواد، توانایی مؤثر در از بین بردن پروتواسکولکس‌ها را دارند؛ ولی به خاطر عوارض سوء مصرف آن‌ها بر روی سایر اعضای بدن، امکان استفاده از آنها محدودتر می‌گردد.

از گذشته‌های بسیار دور محلول فرمالین ۲ درصد را برای سترون کردن کیست به کار می‌بردند. مدت اثر

میزبان باشد، و از طرفی دیگر برای اثبات تأثیر مثبت یا منفی متیلن‌بلو و حصول یک نتیجه قابل اعتماد که در مطالعه نهایی حق پناه و همکاران بی‌اثر بیان شده بود (۲۶)، این دارو انتخاب گردید. محدودیت‌های موجود در طرح حاضر، پیدا کردن کیست هیداتیک بارور انسانی و حیوانی بود. نتایج به-دست آمده بیانگر عدم تأثیر این ماده بر روی پروتواسکولکس‌ها بوده و با نتیجه مطالعه انجام شده در اصفهان هم‌خوانی دارد (۲۶).

در مطالعات دیگری که در رابطه با تأثیر آلبندازول بر روی پروتواسکولکس‌های کیست هیداتیک انجام گردیده و جواب‌های متفاوتی اخذ شده است (۸ و ۲۸)، می‌توان اختلاف بین سویه‌ای در پروتواسکولکس‌های انگل را عامل این امر دانست ولی در مورد متیلن‌بلو، این ماده یک رنگ حیاتی بوده و فاقد اثرات سمی و یا عوارض عمده دیگر بر روی سلول‌های میزبان می‌باشد. حتی در مواردی از جمله مت‌هموگلوبولینمی و پادزهر سیانید، به‌صورت تزریق وریدی در انسان استفاده می‌شود (۲۸).

نظر به اهمیت بیماری هیداتیدوزیس در ایران و از آنجایی که متیلن‌بلو تأثیری بر کشته شدن پروتواسکولکس‌های انگلی ندارد، پیشنهاد می‌شود مطالعات و تحقیقات بیشتر در زمینه دستیابی به یک ماده اسکولکس‌کش قوی و بدون عوارض برای انسان ادامه یابد.

این محلول در کیست‌های ریه و کبد از ایران گزارش شده و علت احتمالی آن، استفاده از نمک‌های محلول در آب ذکر شده است که می‌توانند نیترات نقره را به عنصری سمی تبدیل کنند (۱۲). بتادین هم به‌عنوان یک اسکولکس‌کش توسط جراحان مورد استفاده قرار گرفته است و باعث شد که تحقیقی هم در مورد پروتواسکولکس‌کشی این ماده صورت پذیرد و عدم تأثیر بتادین به‌عنوان یک ماده اسکولوسیدال به اثبات رسید (۱۵ و ۲۵).

در تحقیقی که در رابطه با خاصیت اسکولکس‌کشی متیلن‌بلو بر روی کیست هیداتیک کبد گوسفند در دانشگاه اصفهان طی دو مرحله مقدماتی و نهایی انجام شده، میانگین تعداد اسکولکس‌های کشته شده، حدود ۳/۷۵ درصد و در مرحله مقدماتی همین مطالعه، حدود ۵۰ درصد اعلام گردیده است (۹) که مؤلف، عامل اختلاف موجود بین نتایج مطالعه مقدماتی و طرح اصلی خود را انجام این پژوهش‌ها در دو فصل متفاوت از سال (فصل سرد و گرم)، فاکتور pH، احتمال تفاوت بین نوع گوسفندان و اختلاف در سویه‌های پروتواسکولکس‌های این دو پروژه، ذکر کرده‌اند (۲۶). در مطالعه حاضر از یک طرف برای دستیابی به یک ماده اسکولکس‌کش که بر روی عملکرد فیزیولوژی و بیوشیمیایی انگل تأثیر گذاشته و فاقد اثرات بیوشیمیایی و عوارض جانبی بر روی

## References:

1. Thompson RCA. Biology and Systematics of Echinococcus. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, editors. Echinococcus and hydatid disease. Oxon: CAB International, 1995, 1-50.
2. Schantz P M. Parasitic zoonoses in perspective. Int J Parasitol 1991; 21: 161-70.
3. Torgerson PR, Dowling PM, Abo-Shehadeh MN. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis. Part 3: Jordan, a developing country with lower-middle income. Ann Trop Med Parasitol 2001; 95: 595-603.
4. Yousofi H. Situation of hydatid cyst infection during last two decades (1985-2005) in Iran (Review of articles). J Shahrekord Univ Med Sci 2008; 10: 78-88.
5. Schipper HG, Kager PA. Diagnosis and treatment of unilocular hydatid disease (Echinococcus granulosus infection). Ned Tijdschr Geneesk 1997; 141: 984-9.
6. Ramos G, Orduna A, Garcia-Yuste M, et al. Hydatid cyst of the lung: diagnosis and treatment. World J Surg 2001; 25: 46-57.

7. Alizadeh S A, Kalantari M, Ahrari Kh. A case report on the interaperitoneal rupture of liver Hydatid cyst due to the accident. *J Arak Univ Med Sci* 2009; 12: 111-5.
8. Jamshidi M, Mohraz M, Zanganeh M, et al. Combination therapy of albendazole and praziquantel in treatment of hydatid cyst. *Med Sci J Islamic Azad Univ* 2007; 3: 157-60.
9. Barros JIU. Hydatid disease of the liver. *AM J Surg* 1987; 135: 597-600
10. GhasemiKhah R, Dalimi Asl AH, Hashemi Malayeri B. The lethal effect of low voltage of direct electrical current on the Hydatid cyst Protoscoleces. *Rahavard Danesh, J Arak Uuniv Med Sci* 2003; 23: 32-8.
11. Jamali R, Ahmadi KH, Mahami M, et al. Prevalence of relapse hidatidos in patients of Tabriz hospitals. *The National Congress on Hydatid Cyst. 2007 May. 9-10, Yasuj, Iran.*
12. Eyüpoğlu B, Doğanay M, Reis E, et al. The effects of scolocidal agents on hepatopancreaticobiliary system "An experimental study". *Turkish J Gastroenterol* 1999; 10: 280-6.
13. Belghiti J, Benhamou JP, Houry S, et al. Caustic sclerosing cholangitis. A complication of the surgical treatment of hydatid disease of the liver. *Arch Surg* 1986; 121: 1162-5.
14. Saidi F. *Surgery of Hydatid Disease, 1st ed.* Philadelphia: W.B. Saunders, 1976, 112-21.
15. Jalayer T, Rezazade A. Effects of Butadiene on Hydatid cyst Scolexes. *J Isfahan Med Sch* 1985; 12: 904-13.
16. Koelzow H, Gedney JA, Baumann J, et al. The effect of methylene blue on the hemodynamic changes during ischemia reperfusion injury in orthotopic liver transplantation. *Anesth Analg* 2002; 94: 824-9.
17. Kayaalp C, Balkan M, Aydin C, et al. Hypertonic saline in hydatid disease. *World J Surg* 2001; 25: 975-9.
18. Baron EJ, Finegold SM. *Diagnostic microbiology. 8th ed.* NewYork: Mosby, 1990, 171-86.
19. Dew, H. Operative treatment of hydatid cysts of the liver surgery. *Gynaecol Obstet* 1992; 2: 239-44.
20. Davidson LR. Hydatid cysts of the lung. *Am J Surg* 1955; 89: 1042-53.
21. Pelaez V, Kugler C, del Carpio M, et al. Treatment of hepatic hydatid cysts by percutaneous aspiration and hypertonic saline injection: results of a cooperative work. *Bol Chil Parasitol* 1999; 54: 63-9.
22. Giorgio A, Tarantino L, Francica G, et al. Unilocular hydatid liver cysts: treatment with US-guided, double percutaneous aspiration and alcohol injection. *Radiology* 1992; 184: 705-10.
23. Landa Garcia JJ, Alonso E, Gonzalez-Uriarte J, et al. Evaluation of scolocidal agents in an experimental hydatid disease model. *Eur Surg Res* 1997; 29: 202-8.
24. Dilsiz A, Acikgozoglul S, Gunel E, et al. Ultrasound-guided percutaneous drainage in the treatment of children with hepatic hydatid disease. *Pediatr Radiol* 1997; 27: 230-3.
25. Jalayer T, Askari I. A study of the effect of aqueous iodine on hydatid cysts in vitro and in vivo. *Ann Trop Med Parasitol* 1966; 60: 169-71.
26. Haghpanah B, Ghayur Z, Dolatshahi K. In vitro study of Scolocidal effect of Methylen Blue in Hydatid cyst of liver sheep. *J Res Med Sci* 1998; 1: 28-31.
27. Hazrati Tappeh KH, Aghazadeh J, Musavi SJ. Study of effects of Albendazole Sulfoxide on obviation of Echinococcus granulosus protoscoleces. *Urmia Med J* 2008; 19: 180-1.
28. Behdad A, Memari MR, Ghasemi AA, et al. Methylen blue usage in diagnosis of extent of traumatic necrotizing liver injury. *Feyz J Kashan Univ Med Sci* 2006; 10: 7-10.