مجله تازه های زیست فناوری سلولی - مولکولی
دوره اول، شماره اول، زمستان ۱۳۸۹
Archive of SID

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

اثر هیستامین بر روی رفتارهای شبه اضطرابی در رت های طبیعی و حساس به مرفین

پروین خدارحمی*[۱]، شهربانو عریان[۲]

[۱] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران- ایران
[۲] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران، تهران- ایران

چکیده

سابقه و هدف: در مطالعات نشان داده شده است که هیستامین بر رفتارهای شبه اضطرابی در انسان و حیوانات اثر دارد. شواهدی دیگر نشان می دهد هیپوکامپ شکمی یک جایگاه مهمی در واسطه گری رفتارهای شبه اضطرابی است. در این مطالعه، ارزیابی تجویز هیستامین به صورت دو طرفه بر هیپو کامپ شکمی و اثر آن در موش صحرایی حساس به مرفین بررسی می شود.

مواد و روش ها: رفتارهای شبه اضطرابی تزریق دو طرفه هیستامین در هیپو کامپ شکمی در حیوانات حساس شده به مرفین و معمولی با استفاده از مدل ماز بعلاوه ای شکل بررسی شد. حساسیت به وسیله تزریق ۳ روز مرفین و سپس ۵ روز بدون دارو ایجاد می شود.

یافته ها: نتایج نشان داد هیستامین در دوزهای ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میکرو گرم بر رت در صد زمان گذرانده در بازوی باز و در صد ورود به بازوی باز را کاهش داد ولی بر فعالیت حرکتی تاثیری نداشت. بعلاوه نتایج دیگری نشان می دهد حساسیت به مورفین در صد زمان گذرانده در بازوی باز و در صد ورود به بازوی باز را افزایش می دهد.

نتیجه گیری: یافته ها نشان می دهد، هیستامین یک پاسخ اضطراب زایی دارد ولی حساسیت به مرفین یک پاسخ اضطراب زدایی به وسیله مرفین در حضور هیستامین ایجاد می کند.

کلمات کلیدی: هیستامین، اضطراب، حساسیت، ماز بعلاوه شکل، رت

مقدمه

هیستامین یک نوروترانس میتر مغز و تعدیل کننده عصبی است که در بسیاری از عمل کردهای فیزیولوژیک مانند بر انگیختگی، چرخه خواب و بیداری، کنترل اشتها، حالت های عصبی، حافظه و یاد گیری و رفتارهای تهاجمی و احساس دخالت دارد (Brown et al., 2001; Ito et al., 2000; Passani et al., 2007). هیستامین در هسته های اجسام پستانی هیپوتالاموس پشتی آزاد و انشعاباتش را به نواحی مختلف مانند کورتکس مغز، تالاموس، آمیگدال و هیپوکامپ می فرستد (Brown et al., 2001). شواهد نشان می دهد هیستامین هیپوکامپ تحریک پذیری نورون ها را افزایش داده (Selbach et al., 1997)، یاد گیری و حافظه (DaSilva et al., 2006) و رفتارهای شبه اضطرابی را تنظیم می کند (Rostami et al., 2006; Yuzurihara et al., 2000).

آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه آزاداسلامی واحد پرند، دانشکده ی علوم زیستی، گروه زیست شناسی
Email : khodarahmiparvin@yahoo.com.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۸/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۰/۱۶
www.SID.ir

از طرفی، نشان داده شده که تجویز عوامل هیستامینرژیک در آمیگدال مرکزی (Zarrindast et al., 2005b)، هسته های آکومبنس (Orofino et al., 1999) پوکامپ پشتی (Zarrindast et al., 2006a) بر رفتارهای شبه اضطرابی و ترس اثر دارد.

نتایج قبلی هم چنین یک اثر اضطراب زایی برای تزریق یک طرفه هیستامین در هیپوکامپ شکمی نشان داده است (Rostami et al., 2006). به هر حال هیپوکامپ شکمی یک جایگاه مهم برای اثرات شبه اضطراب زدایی شناخته شده است (Bannerman et al., 2003; Wright et al., 1992). شواهد نشان می دهد که تجویز تکراری مرفین رفتارهای شبه اضطرابی را در حیوانات آزمایشگاهی تغییر می دهد (Carlezon and Nestler., 2002; Kuribara., 1995; Li et al., 2006; Shippenberg et al., 1998)، که این پدیده به عنوان حساسیت رفتاری شناخته شده است و به در گیری سیستم های نوروترانسمیتری متفاوت در جایگاه های مغزی متفاوت وابسته است. قبلا نشان داده شده است که تجویز تکراری مرفین القاء حساسیت حرکتی در رت ها ایجاد می کند (Zarrindast et al., 2007b) و فراموشی ایجاد شده به وسیله مرفین را مهار می کند

Archive of SID

(Zarrindast and Rezayof., 2004). از طرف دیگر، ترک مرفین با ایجاد بسیاری علائم حرکتی منفی مانند افزایش اضطراب و جستجوی دارویی نشان داده شده است (Aston-Jones and Harris., 2004) و همچنین ترک اوپیوئیدی می تواند باعث رفتارهای اضطرابی در EPM (Elevated Plus Mase) شود (Schulteis et al., 1998; Zhang and Schulteis., 2008). بر اساس این یافته ها هدف از مطالعه اخیر ارزیابی تجویز هیستامین به صورت دو طرفه بر هیپوکامپ شکمی و ارزیابی اثر هیستامین در موش های صحرایی حساس شده به مرفین بود.

مواد و روش ها

حیوانات مورد آزمایش در این تحقیق از موش های صحرایی نر نژاد ویستار به وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. موش ها در قفس های جدا در گروه های چهارتایی نگهداری شده و درجه حرارت اتاق پرورش حیوانات ۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد بود و تنظیم نور بر اساس سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. به جزء در زمان آزمایش آب و غذای کافی در دسترس حیوان قرار داشت. موش ها روزی ۳ دقیقه جهت کاهش اضطراب احتمالی نوازش می شدند تا با شخص آزمایش کننده، خو بگیرند. هر حیوان تنها یک بار استفاده شده و پس از انجام آزمایش حذف شد. عمل جراحی و کانول گذاری حیوانات توسط تزریق درون صفاقی کتامین سولفات ۵۰mg/kg و زایلازین ۴mg/kg بیهوش گشته و بعد از کوتاه کردن موهای ناحیه سر، آن ها در دستگاه استریوتاکسی کانول گذاری می شدند. کانول راهنما از بریدن سوزن های شماره ۲۲ تهیه می شدند و بر اساس اطلس پاکسینوس در ناحیه هیپوکامپ شکمی راست و چپ به مختصات ۴/۵-۳/۵ میلی متر به سمت عقب از برگما، ۵-۳/۹ میلی متر به سمت راست و چپ از خط وسط و ۸-۶/۲ میلی متر به عمق از سطح سخت شامه بر حسب وزن حیوان تعبیه می شدند. برای ثابت ماندن کانول از سیمان دندان پزشکی (مونومر و آکریل) استفاده شد و برای جلوگیری از گرفتگی درون کانول از سیم نازک که از بریدن سوزن های ۲۷ دندان پزشکی تهیه می شد، استفاده شد (Paxinos and Watson., 1986).

تست رفتاری EPM (Elevated Plus Maze)

برای سنجش اضطراب از مدل رفتاری ماز بعلاوه ای شکل استفاده شد. این ابزار بر اساس دو غریزه طراحی شده است، یکی حس جستجو گرانه جوندگان و دیگری احتراز از محیط های باز و روشن می باشد. در این روش حیوان بیشتر وقت خود را در بازوهای باز گذرانده و تمایل بیشتر به گذراندن در این بازوها را دارد.

www.SID.ir

این ابزار از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت مثبت (+) است. ابعاد راهرو باز و بسته ۱۰×۵۰ بوده و دو طرف و انتهای راهرو بسته دیواره ای به بلندی ۴۰ سانتی متر داشته و برای جلوگیری از افتادن موش های صحرایی در دو طرف و انتهای بازوی باز لب های به ارتفاع یک سانتی متر از جنس شیشه نصب گردید. چهار راهرو به یک محدوده مرکزی به ابعاد۱۰× ۱۰ سانتی متر منتهی می شوند. ماز توسط پایه هایی در ارتفاع ۵۰ سانتی متر از سطح زمین قرارمی گیرد. موش ها درون محدوده مرکزی قرار می گیرند، به طوری که روبه یک بازوی باز قرار می گرفتند. نور مناسب توسط یک لامپ ۱۰۰ واتی که در ارتفاع ۱۲۰ سانتی متری از مرکز ماز قرار داشت، تامین می شد. در مدت پنج دقیقه ای که حیوان آزادانه در قسمت های مختلف ماز حرکت می کرد، پارامترهای زیر به روش مشاهده اندازه گیری می شد:

۱- تعداد دفعاتی که حیوان وارد راهرو باز می شود.

۲- تعداد دفعاتی که حیوان وارد راهرو بسته می شود.

۳- مدت زمانی که حیوان در راهرو باز باقی می ماند.

۴- مدت زمانی که حیوان در راهرو بسته باقی می ماند.

منظور از ورود به راهرو باز یا بسته هنگامی است که هر چهار پای حیوان در راهرو مورد نظر قرار می گرفت. زمان گذرانده شده در هر راهرو نیز بر همین اساس محاسبه شده است. برای هر حیوان در صد ورود به بازوی باز ودر صد زمان گذرانده شده در راهرو باز به طریق زیر محاسبه شده است:

$$\text{درصد ورود به راهرو باز} = \frac{\text{تعداد ورود به راهرو باز}}{\text{تعداد ورود به راهرو باز + تعداد ورود به راهرو بسته}} \times ۱۰۰$$

$$\text{درصدزمان‌گذرانده‌شده‌درراهروباز} = \frac{\text{مدت زمان گذرانده شده در راهرو باز}}{\text{مدت زمان گذرانده شده در راهرو باز +مدت زمان گذرانده شده در راهرو بسته}} \times ۱۰۰$$

افزایش معنی دار این دو پارامتر نشان دهنده کاهش اضطراب در این تست است. البته فاکتور OAT نسبت به فاکتور OAE دارای حساسیت کمتری در ثبت رفتارهای اضطرابی و یا ضد اضطرابی حیوان است (Rodgers and Johnson., 1995).

داروها

داروهای مورد استفاده شامل هیستامین دی هیدروکلراید (تهیه شده از شرکت مرک، آلمان) می باشد، مرفین سولفات

Archive of SID

(تهیه شده از شرکت تماد، تهران، ایران)، تمام داروها در سالین استریل ۰/۹ در صد حل می شدند. تزریق هیستامین به صورت داخل هیپوکامپی اما تزریق مرفین بصورت زیر پوستی انجام می گرفت.

درمان دارویی

آزمایش۱- اثر هیستامین در ناحیه هیپوکامپ شکمی بر اضطراب در این تجربه، حیوانات سالین و یا هیستامین در دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ و به میزان یک میکرو گرم در هر رت دریافت کردند. پنج دقیقه بعد از تزریقات درون هیپوکامپی در صد OAE، OAT و فعالیت حرکتی اندازه گیری شد.

آزمایش ۲- اثر تزریق هیستامین در ناحیه هیپوکامپ شکمی بر روی رفتار موش های حساس شده به مرفین در این تجربه، همه حیوانات سالین یک میلی لیتر/ کیلوگرم یا مرفین ۷/۵ میلی گرم/ کیلوگرم به صورت زیر پوستی برای سه روز دریافت کردند، سپس پنج روز هیچ دارویی دریافت نشد. روز نهم همه گروه ها به صورت درون هیپوکامپ شکمی سالین یک میلی لیتر در هر رت یا دوزهای متفاوت هیستامین (۲/۵، ۵ و ۷/۵ میکرو گرم در هر رت) دریافت کردند. پنج دقیقه بعد از تزریقات درون هیپوکامپی در صد OAE، OAT و فعالیت حرکتی اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

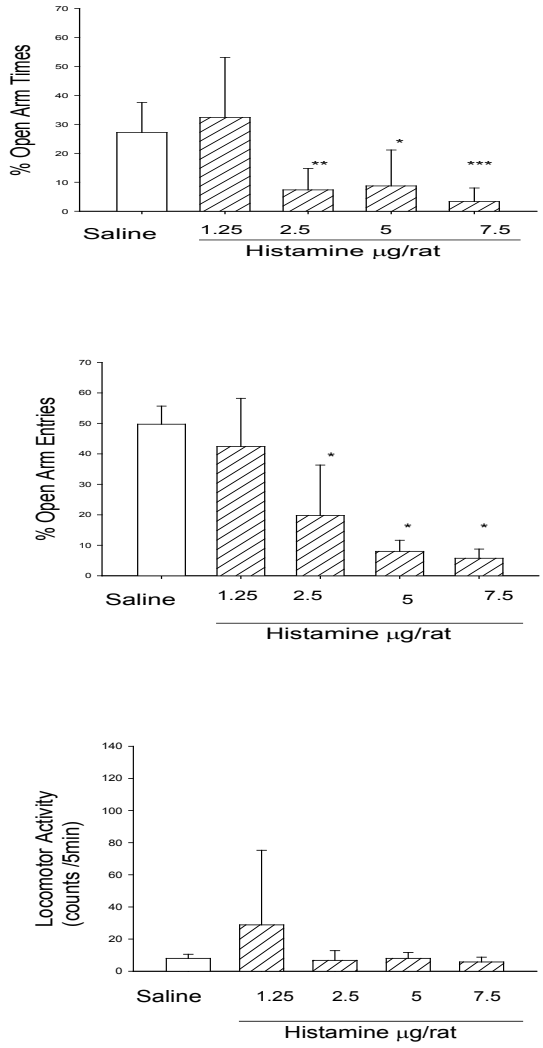
محاسبات از طریق انجام روش آنالیز واریانس یک طرفه برای مقایسه گروه ها با گروه کنترل آنها و آنالیز دو طرفه برای مقایسه گروه های کنترل با گروه های حساس شده بوسیله مرفین استفاده شد و سپس بعد از یک F معنی دار، آنالیز به کمک Post hoc ادامه یافت. از لحاظ آماری p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار فرض شد. برای رسم نمودارها از آنالیز آماری Excel استفاده شد.

یافته ها

آزمایش ۱- بررسی اثر تزریق هیستامین در ناحیه هیپوکامپ شکمی.

در این تجربه حیوانات سالین و یا هیستامین در دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میکرو گرم در رت دریافت کردند. شکل ۱ نشان می دهد تزریق هیستامین در ناحیه هیپو کامپ شکمی در دوزهای ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میکرو گرم در هر موش و به حجم یک میکرولیتر در هر موش باعث کاهش در صد زمان گذرانده در بازوی باز و کاهش در صد تعداد ورود به بازوی باز گردید، ولی بر تعداد فعالیت حرکتی اثری نداشت که نشان دهنده افزایش اضطراب در گروه های مورد مطالعه است. $p<0.05$ + و $p<0.01$ ++ و $p<0.001$ +++ اختلاف از گروه کنترل است.

آزمایش ۲- بررسی اثر تزریق هیستامین در ناحیه هیپوکامپ شکمی در موش های حساس شده به مرفین در این تجربه چهار گروه از حیوانات بعد از



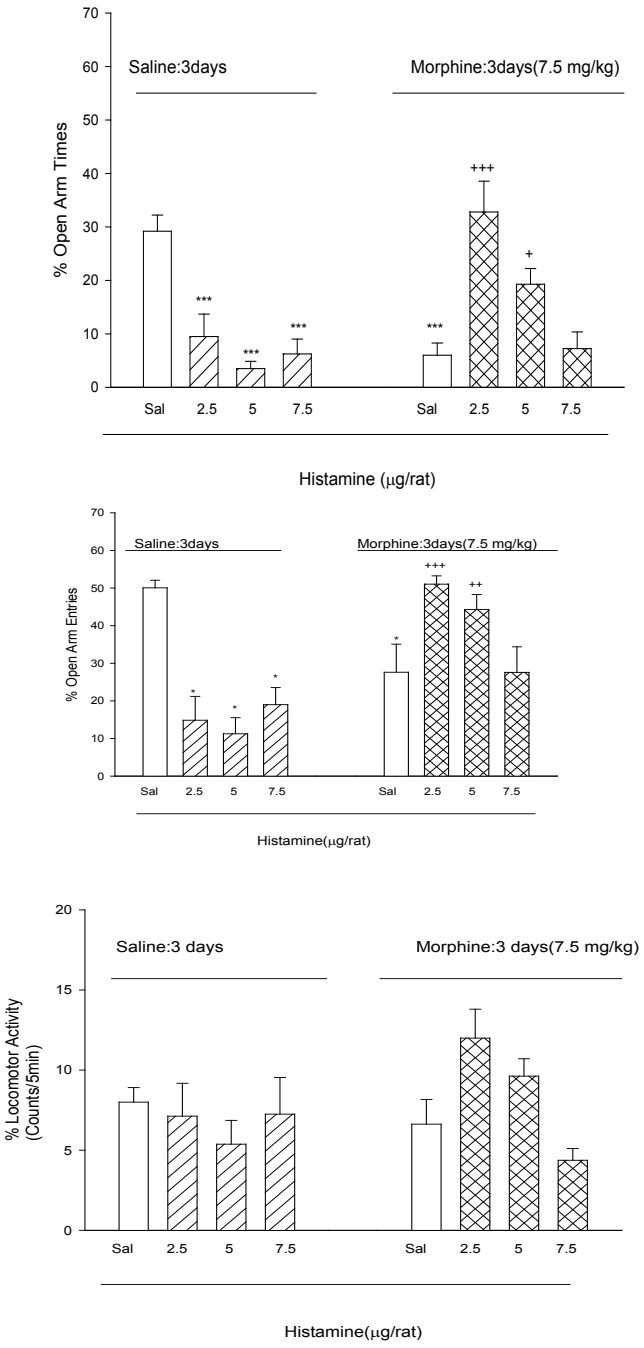
شکل ۱- تزریق هیستامین در هیپوکامپ شکمی در روزهای ۲/۵، ۵، ۷/۵.

بهبودی (پنج روز) به مدت سه روز سالین و چهار گروه دیگر ۷/۵ میلی گرم/کیلو گرم مرفین دریافت کردند. بعد از پنج روز که دارویی دریافت نشد، تمام گروه ها پنج دقیقه قبل از تست رفتاری سالین یا سه دوز (۲/۵، ۵ و۷/۵ میکرو گرم بر موش) هیستامین دریافت کردند.

شکل۲ نشان می دهد تزریق هیستامین در دوزهای ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میکروگرم در ناحیه هیپوکامپ شکمی در موش های حساس شده با مرفین در دوز ۷/۵ میلی گرم به ازاء هر کیلو گرم وزن باعث افزایش در صد زمان گذرانده در بازوی باز و افزایش درصد تعداد ورود به بازوی باز گردید، ولی بر فعالیت حرکتی اثری ولی بر فعالیت حرکتی اثری نداشت که نشان دهنده کاهش اضطراب در گروه های مورد مطالعه است. $p<0.05$ + و $p<0.01$ ++ و $p<0.001$ +++ اختلاف از گروه کنترل است

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تزریق هیستامین در هیپوکامپ در موش حساس به مرفین در روزهای ۲/۵، ۵، ۷/۵.

بحث

در این مطالعه اثر حساسیت به مرفین بر رفتارهای شبه اضطرابی به وسیله هیستامین در ناحیه هیپوکامپ شکمی در مدل ماز بعلاوه ای شکل بررسی شد. ماز بعلاوه ای شکل یک مدل برای شناسایی اثر داروهای اضطراب زا و ضد اضطراب می باشد (Paxinos and Watson., 1986). نتایج ما نشان داد تزریق دو طرفه هیستامین درون هیپوکامپ شکمی در صد OAT و OAE را کاهش می دهد، که نشان دهنده یک اثر اضطراب زایی در EPM می باشد. در همین راستا رستمی نشان داده است که تزریق هیستامین به صورت یک طرفه در هیپوکامپ شکمی اثر اضطراب زایی دارد (Rostami et al., 2006)، که حمایت می کند این پیشنهاد را که رسپتورهای هیستامین در هیپوکامپ یک نقش تنظیمی بر روی رفتارهای شبه اضطرابی دارد (Ruarte et al., 1997). تجربیات قبلی به وسیله مالمبرگ- ایلو و همکارانش نیز نشان داده بود که فعالیت گیرنده های H1 هیستامینی می تواند اثرات اضطراب زایی ایجاد کند (Malmberg-Aiello., 2002). در گذشته نیز نشان داده شده است که تجویز تکراری مرفین و به دنبال آن یک دوره بدون دارو ایجاد حساسیت رفتاری می کند (Scheggi et al., 2000; Zarrindast et al., 2007b). البته این پدیده برای چندین اثر رفتاری مانند حافظه، پاداش و فعالیت حرکتی قبلا نشان داده شده است (Kuribara., 1995; Serrano et al., 2002). تجربیات قبلی نشان داده شده است که نقص در حافظه ناشی از تجویز هیستامین، در موش سوری حساس شده با مرفین کاهش می یابد و موش های سوری که در آن ها فراموشی با هیستامین ایجاد شده بود، در نتیجه حساسیت زایی با آپومورفین، حافظه آن ها تقویت شد. (Zarrindast et al., 2006b). به علاوه بعضی تحقیقات نشان داده که سیستم هیستامینرژیک در میانجی گری رفتارهای شبه اضطرابی که می تواند به وسیله ترک مرفین ایجاد شود، دخالت دارد (El Kadi and Sharif., 1996; Henwood and Mazurkiewicz- Kwilecki., 1977; Oishi et al., 1988). این بررسی ها و یافته ها حاکی از آن است که تزریق دو طرفه هیستامین در ناحیه هیپوکامپ شکمی یک اثر اضطراب زایی ایجاد می کند و اضطراب زایی ناشی از هیستامین در موش های حساس شده با مرفین کاهش می یابد. بررسی بر هم کنش سیستم هیستامینرژیک با اپیوئیدارژیک و در گیری سایر گیرنده ها نیاز به بررسی دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، انجمن علمی زیست شناسی دانشجویان دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری رساندند، تقدیر و تشکر می شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Aston-Jones G, Harris GC. Brain substrates increased drug seeking during pro tracted wi thdra wal. Neuropharmacology, 2004; 47: 167–179.

2- Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine. Prog Neuro biol, 2001; 63: 637–672.

3- Carlezon WA, J Nestler EJ. Elevated levels of GluR1 in the midbrain: a trigger for sensitization to drugs of abuse? Trends Neurosci, 2002; 25: 610–615.

4- Da Silva WC, Bonini JS, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M. Histamine en hances inhibito r y avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent me chanism. Neurobiol Learn Mem, 2006; 86: 100–106.

5- El Kadi AO, Sharif SI. The role of histaminergic–noradrenergic axis in naloxone-in duced withdra wal symptoms in mice.Pharmacol Biochem Behav, 1996; 55: 49–54.

6- Henwood RW, Mazurkiewicz-Kwilecki IM. Effect of histidine on morphineinduced changes in brain histamine Agents Actions, 1977; 7: 495–500.

7- Kuribara, H. Modification of morphine sensitization by opioid and dopamine receptor antagonists: evaluation by studying ambulation in mice. Eur J Pharmacol, 14, 251–258.

8- Kuribara H. Modification of morphine sensitization by opioid and dopamine recep tor antagonists: evaluation by studying ambulation in mice. Eur J Pharmacol, 1995; 275: 251–258.

9- Malmberg-Aiello P, Ipponi A, Bartolini A, Schunack W. Mouse light/dark box test reveals anxioge niclike effects by activation of histamine H1 receptors. Pharmacol Biochem Behav, 2002; 71: 313– 318.

10- Oishi R, Nishibori M, Itoh Y, Saeki K, Fukuda T, Araki Y. Histamine turnover in the brain of mor hine-dependent mice. N– S Arch Pharmacol, 1988; 337: 58–63.

11- Orofino AG, Ruarte MB, Alvarez EO. Exploratory behavior after intra-accum bens histamine and/or histamine antagonists injection in the rat. Behavioral Brain Research, 1999; 102: 171–180.

12- Passani MB, Giannoni P, Bucherelli C, Baldi E, Blandina P. Histamine in the brain: beyond sleep and memory. Bioche Pharmacol, 2007; 73: 1113–1122.

13- Rostami P, Hajizadeh-Moghadam A, Zarrindast MR. The effects of histaminergic agents in the ventral hippocampus of rats in the plus-maze test of anxiety-like behaviours. Physiol Behav, 2006; 87: 891–896.

14- Ruarte MB, Orofino AG, Alvarez EO. Hippocampal histamine receptors and conflictive explo ration in the rat: studies using the elevated asymmetric plus-maze. Braz J Med Biol Res, 1997; 30: 1451– 1461.

15- Scheggi S, Masi F, Tagliamonte A, Gambarana C, Tolu P, De Montis MG. Rats sensitized to mor phine are resistant to the behavioral effects of an unavoidable stress. Brain Res, 2000; 853: 290 298.

16- Schulteis G, Yackey M, Risbrough V, Koob GF. Anxiogeniclike effects of spontaneous and na loxone -precipitated opiate withdrawal in the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav,
1998; 60: 727–731.

17- Selbach O, Brown RE, Haas HL. Long-term increase of hippocampal excitability by histamine and cyclic AMP. Europharmacology, 1997; 36: 1539 1148.

18- Serrano A, Aguilar, M A , Manzanedo C , Rodriguez-Arias M, Minarro J. Effects of DA D1 and D2

www.SID.ir

Archive of SID

antagonists on the sensitization to the motor effects of morphine in mice. Progress Neuro-Psycopharmacol Biol Psychiatry, 2002 ;26: 1263–1271- pharmacology and temporal characteristics. Eur J Pharmacol, 1996; 299: 33–39.

19- Shippenberg TS, Heidbreder C, Lefevour A. Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine:

20- Yuzurihara M, Ikarashi Y, Ishige A, Sasaki H, Maruyama Y. Anxiolytic-like effect of saiboku-to, an oriental herbal medicine, on histaminergics-induced anxiety in mice. Pharmacol Biochem Behav, 2000; 67: 489–495.

21- Zarrindast MR, Farahmandfar M, Rostami P, Rezayof A. The influence of central administration of dopaminergic and cholinergic agents on morphine-induced amnesia in morphine-sensitized ice. J Psychopharmacol, 2006b; 20: 59–66.

22- Zarrindast MR, Heidari-Darvishiani A, Rezayof A, Fathi- Azarbaijani F, Jafari-Sabet M, Hajizadeh-Moghaddam A. Morphine-induced sensitization in mice: changes in locomotor activity by prior sche duled exposure to GABAA receptor agents. Behav Pharmacol, 2007b; 18: 303–310.

23- Zarrindast, MR, Khalilzadeh A, Malekmohammadi N, Fazli-Tabaei S. Influence of morphine- or apomorphine-induced sensitization on histamine state-dependent learning in the stepdown passive avoidance test. Behav Brain Research, 2006b; 171: 50–5.

24- Zarrindast MR, Moghadam AH, Rostami P, Roohbakhsh A. The effects of histaminergic agents in the central amygdala of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. Behav Pharmacol, 2005b; 16: 643–649.

25- Zarrindast MR, Torabi M, Rostami P, Fazli-Tabaei S. The effects of histaminergic agents in the dor sal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. Pharmacol Biochem Behav, 2006a; 85: 500–506.

26- Zarrindast MR, Rezayof A. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. Eur J Pharmacol, 2004 ;497: 197–204.

27- Zhang Z, Schulteis G.Withdrawal from acute morphin e dependence is accompanied by increased anxiety-like behavior in the elevated plus maze. Pharmacol Biochem Behav, 2008; 89: 392 403.

www.SID.ir