بررسی تاثیر اتانل بر بقای سلول های فیبروبلاست انسانی

پونه امینی‌گرام[1]، سعید حیدری کشل[2]، مونا زمانیان عضدی[2]، مجید رضایی طاویرانی[3]، غلام بساطی[4]، مصطفی رضایی طاویرانی[2*]

1) واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران
2) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
3) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
4) گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: 91/10/6 تاریخ پذیرش: 92/3/13

چکیده

مقدمه: مصرف اتانل یا الکل اتیلیک(C2H5OH) می تواند عوارض سمی در بدن داشته و موجب تغییرات گسترده‌ای در سلول های بدن شود. اتانل در بدن به عنوان یک متابولیت عادی محسوب نمی شود و متابولیسم آن از مسیرهای متنوعی انجام می گیرد. در یک مسیر آلدئید دئیدروژناز، اتانل به استالدئید و در مرحله بعد به یک ماده جنبی با فعالیت کمتر به نام استات تبدیل می شود. در صورتی که مقدار مصرفی آن بالا باشد، مسیرهای دیگری به کار می آیند که سبب به وجود آمدن متابولیت های فرعی خطرناکی از جمله گونه های اکسیژنی فعال(ROS) Reactive oxygen species شوند که می توانند به DNA و پروتئین ها آسیب رسانده و ترکیبات سرطان زا ایجاد کنند.

مواد و روش ها: در این پژوهش در دو مرحله اثر غلظت های مختلف اتانل بر سلول های فیبروبلاست انسانی توسط روش های مشاهده میکروسکوپی Invert و تست بقا MTT assay مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که در مرحله اول پس از 48 ساعت انکوباسیون در محیط کشت RPMI حاوی غلظت های مختلفی از الکل و در ادامه در مرحله دوم به منظور بررسی پایداری و ناپایداری اثر اتانل بر نسل های بعدی این سلول ها به مدت 48 ساعت نیز در محیط کشت فاقد اتانل کشت داده شدند.

یافته های پژوهش: مطالعات تست بقا نشان داد که پس از 48 ساعت انکوباسیون در غلظت های مختلفی از اتانل میزان بقا سلول های فیبروبلاست انسانی تغییر می یابد. از سوی دیگر در ادامه کشت سلول ها در محیط فاقد اتانل به مدت 48 ساعت تغییراتی را در میزان بقا در نسل های بعدی مشاهده شد که این نتایج به کمک مطالعات میکروسکوپی تایید گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به تغییرات بقای سلول های فیبروبلاست در شرایط غیاب الکل این گونه می توان نتیجه گرفت که اتانل سبب تغییراتی در سطح ژنتیکی نسل های بعدی سلول ها شده است و پیشنهاد می گردد که بررسی در سطح ژنتیکی و تعیین کاریوتیپ این سلول ها انجام شود تا امکان بروز اختلالات ژنتیکی مشخص گردد.

واژه های کلیدی: اتانل، فیبروبلاست، مورفولوژی، بقا سلولی

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

Email: rezaeitavirani@ibb.ut.ac

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

اتانل یکی از رایج ترین داروهای مورد استفاده در سراسر دنیا است که می تواند اثرات زیان آوری برای بدن داشته باشد. از جمله آسیب عمده آن بر مغز است که کارکرد طبیعی آن را دچار تغییر یا اختلال می کند،(1). این تغییرات شامل اثراتی است که بر ناقل های عصبی وارد شده و سیگنال های مغزی را کاهش و منجر به مرگ سلولی می شود،(2). مصرف طولانی مدت الکل، تأثیرات فیزیکی بسیاری بر بدن وارد می سازد که یکی از آن ها افزایش مرگ سلولی در کبد و سخت شدن بافت کبدی یا سیروز کبدی(cirrhosis of liver) و افزایش آپوپتوز سلولی در مناطق مختلف مغز است،(3). آگاهی از مکانیسم های مرگ سلولی متأثر از اتانل، این امکان را به ما می دهد که استفاده از راهکارهای مقابله با آن را بیاموزیم. کودکانی که در دوران جنینی در معرض الکل بوده‌اند، طیف وسیعی از بیماری ها، از جمله اختلالات تمایز نورونی وابسته به الکل تا سندروم های جنین الکلی را نشان می دهند،(4). تأثیر اتانل در کاهش تکثیر سلول های عصبی نشان دهنده نقش آن در بروز سندرم جنین الکلی است،(5). تماس با اتانل چه کوتاه مدت و چه بلند مدت از طریق چندین عامل مانند تجمع استالدئید و پروتئین‌های تغییریافته، تغییر وضعیت مکانیسم اکسید و احیاء سلولی، فعالیت سمی میکروزومالی، تخریب فعالیت های میتوکندریایی و تجمع سیتوتوکسین ها، در لنفوسیت ها اعمال می شود،(6). اتانل در تکثیر سلول های مختلفی از جمله استروسیت ها، سلول های T انسانی و هپاتوسیت های بنیادی رت در حالت Invitro تأثیر می گذارد. تأثیر ضد تکثیری اتانل ممکن است عامل بیماری زایی آن باشد، بیماری های کبدی ناشی از مصرف الکل، نتیجه مستقیم تضعیف فعالیت تکثیری سلول های کبدی، به دلیل جلوگیری از سنتز DNA وابسته به فاکتور رشد تحریک شده می باشد،(7). اختلالاتی که اتانل پدید می آورد، ممکن است اختلالات سطحی و یا اختلالاتی در رشد بدن، رشد مغز، آسیب هایی به حافظه، عدم تمرکز و یادگیری و حتی اختلالات روانی و شخصیتی مانند افسردگی باشند،(8). اتانل از طریق مداخله در مکانسیم های مرگ سلولی، آسیب به سیستم های امنیتی و برهم زدن تنظیمات شبکه انتقال نورونی مثل GABA، سیستم های گلوتامات و سروتونرژیک اثرخود را بر بدن اعمال می کند،(۹،۱۰). یکی از مهم ترین اثراتی که اتانل روی بدن می گذارد، تضعیف سیستم عصبی مرکزی است. پس از مصرف اتانل، فرایند های یادگیری، آموزش، قدرت تمرکز دچار اختلال می گردند. مصرف مزمن الکل با اختلالات وخیم عصبی و روانی، مانند آسیب مغزی، از دست دادن قوه حافظه، اختلال درخواب و جنون نیز همراه است. مکانیسم نوروشیمیایی اثرات تضعیفی اتانل بر روی سیستم عصبی مرکزی هنوز به طور کامل مشخص نشده است ولی احتمالاً تجمع اتانل گیرنده GABA را تحریک می کند. GABA مهم ترین نوروترانسمیتر مهاری مغز است. اتانل با افزایش هدایت یون های Cl به درون سلول، اثر GABA را افزایش می دهد. الکل با تاثیر بر اتصالات شکافدار بین سلول های اپیتلیال دیواره مویرگ های مغز، نفوذپذیری سد خونی-مغزی را نیز دچار تغییر می کند،(10). مطالعات سال های اخیر نشان داده است که علت اصلی سرطان زایی الکل، مربوط به تأثیر آن بر میزان تولید فاکتورهای رشد مؤثر در رگ زایی و از جمله فاکتور رشد اندوتلیالی(VEGF) می باشد. الکل میزان تولید این فاکتور را که برای رگ زایی (مخصوصاً در تومورها) لازم است، افزایش می دهد. در ضمن الکل سرعت تجزیه مواد سرطان زای موجود در سیگار را کاهش می دهد، بنا بر این در افراد سیگاری که الکل نیز مصرف می کنند، احتمال بروز سرطان بسیار بیشتر می شود،(۱۱،۱۲). اتانل نسبت بالای واکنش(اگزالواستات به مالات) را در چرخه کربس به سمت مالات هدایت می‌کند. در نتیجه فعالیت چرخه کربس کاهش می یابد و اکسیداسیون اسیدهای چرب را مهار می کند. از طرفی استات تولید شده از اکسیداسیون اتانل با تبدیل به استیل کوآنزیم A، پیش ساز لازم سنتز اسیدهای چرب را فراهم کرده و در نتیجه تولید اسیدهای چرب را تحریک می کند و در مجموع سبب تراکم چربی در کبد(کبد چرب)،

www.SID.ir

افزایش لیپید در خون و سرانجام بیماری سیروز کبدی می شود،(13). با مصرف مداوم الکل، کلسترول غشاء سلول افزایش یافته و اسیدهای چرب اشباع جایگزین اسیدهای چرب غیر اشباع خواهند شد، همین تغییرات غشاء به علاوه تحریک سیستم آنزیمی سیتوکروم ـ P450، احتمالاً سبب افزایش تحمل افراد الکلی به اتانل می شود،(14). به همین منظور در این مطالعه اثر اتانل بر سلول های فیبروبلاست انسانی به عنوان یک سلول کم تمایز یافته و مهم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

سلول های فیبروبلاست در فلاسک حاوی محیط کشت RPMI کشت داده شد و به پلیت 96 خانه ای که در هر خانه 200 میکرولیتر محیط کشت RPMI وجود داشت انتقال یافتند و سپس برای ساخت غلظت های 54، 108، 200، 216، 270، 324، 378 و 422 میلی‌مولار اتانل به ترتیب در هر 5 خانه پلیت 0/5، 1، 1/186، 2، 2/5، 3، 3/5، و4 میکرولیتر اتانل اضافه گردید. پس از 48 ساعت انکوباسیون در انکوباتور با دمای 37 در جه سانتی گراد، 5 CO2 درصد و رطوبت 90 درصد، مورفولوژی و بقا سلول ها بررسی شد. هم چنین سلول ها را در محیط کشت RPMI بدون اتانل کشت داده و پس از 48 ساعت بررسی مجدد انجام گرفت.

مطالعه میکروسکوپی رده های سلولی مورد آزمایش قبل و بعد از انکوباسیون با اتانل

جهت اطمینان از صحت کار(توزیع یکنواخت سلول ها در تمامی خانه های مورد آزمایش) و عدم آلودگی سلول ها قبل از انکوباسیون با اتانل، تمامی خانه ها با میکروسکوپ فاز معکوس مورد مطالعه قرار گرفت. هم چنین بعد از انکوباسیون با اتانل در 48 ساعت اول و نیز انکوباسیون های بعدی در محیط کشت فاقد اتانل در 48 ساعت مشاهده میکروسکوپی انجام شد. سلول های انکوبه شده تحت تأثیر اتانل، قبل از لیز شدن دچار تغییرات مورفولوژیک می گردند. (چروکیده شدن سلول های سوسپانت و کروی شدن سلول های چسبیده) تمامی این تغییرات، توسط میکروسکوپ فاز معکوس بررسی و شکل برداری شد.(۱۵،۱۶)

روش سنجش بقای سلولی

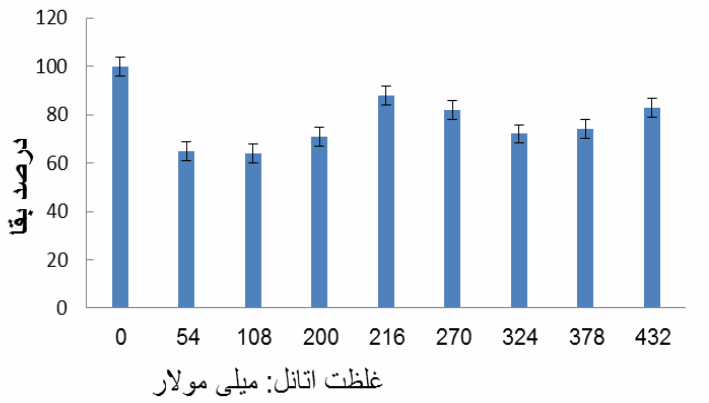
روش سنجش میزان فعالیت حیاتی توکسیسیتی در رده سلولی اثر داده شده با مواد سمی را می توان با استفاده از رنگ آمیزی های استاندارد سنجید. یکی از این روش ها MTT Assay است که معمولاً برای بررسی بقای سلول ها به کار می رود. این روش بر اساس احیای رنگ 3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide استوار است. در سلول های زنده، فعالیت آنزیم های دهیدروژناز و ردوکتاز میتوکندریایی، MTT زرد رنگ محلول را به یک فرآورده نامحلول به نام فورمازان که بنفش متمایل به آبی است تبدیل می کند،(۱۵،۱۷). پس از انکوباسیون سلول ها با غلظت های مختلف اتانل در مدت زمان 48 ساعت و انکوباسیون بدون الکل به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد سلول ها با محلول MTT 0/5mg ml-1 به میزان 10 درصد محیط کشت رنگ آمیزی شدند و بعد از 4 ساعت انکوباسیون در 37 درجه سانتی گراد مایع رویی سلول ها حذف و به جای آن 200 میکرولیتر محلول DMSO به هر خانه اضافه شد. پلیت ها به مدت 10 تا 15 دقیقه روی شیکر قرار گرفتند و سپس مقادیر جذب نمونه ها در طول موج 570 نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.(18)

یافته های پژوهش

تأثیر اتانل بر بقاء سلول های فیبروبلاست

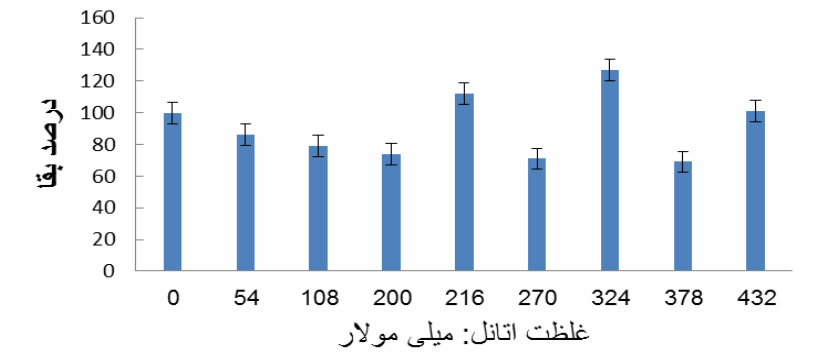
سلول ها به مدت 48 ساعت در محیط حاوی غلظت های مختلف اتانل شامل(54، 108، 200، 216، 270، 324، 378 و 422 میلی مولار) انکوبه شدند. (شکل شماره 1)

www.SID.ir



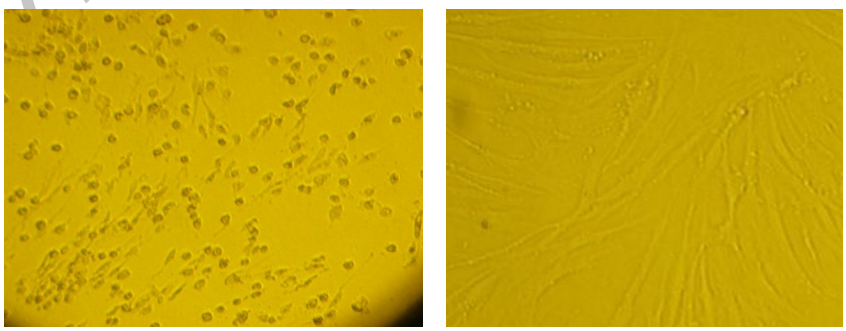
شکل شماره 1. بقای سلول ها بعد از 48 ساعت انکوباسیون با الکل. بقا در غلظت های 54 و 108 میلی مولار با P کمتر از 0/001 از کنترل کمتر است

بررسی پایداری تأثیر اتانل بر بقاء سلول های فیبروبلاست: سلول هایی که در مجاورت اتانل قرار گرفته بودند به مدت 48 ساعت در محیط فاقد اتانل انکوبه شدند.(شکل شماره 2)



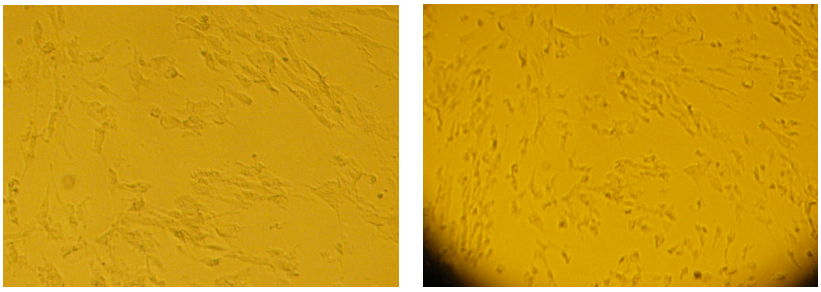
شکل شماره 2. بقای سلول های فیبروبلاست انسانی که 48 ساعت در حضور غلظت های مختلف اتانول قرار گرفته بودند و سپس در محیط فاقد اتانل کشت داده شده و بعد از 48 ساعت بررسی شدند. (بقا در غلظت های 200، 270، 324 و 378 با $P<0.01$ نسبت به کنترل، به صورت معنی داری تغییر یافته است.)

روش های بررسی میکروسکوپی به منظور مشاهدات تغییرات مورفولوژی و تأیید نتایج آزمون های تست بقا انجام گرفت.(شکل شماره ۳،۴)



شکل شماره3. راست: فیبروبلاست نرمال بعد از 48 ساعت کشت در محیط فاقد الکل چپ: سلول های کروی و دوکی شکل فیبروبلاست در محیط کشت حاوی 54 میلی مولار اتانل(میکروسکوپ فاز معکوس بزرگ نمایی 1000)

www.SID.ir



شکل شماره 4، راست: سلول های کروی و دوکی شکل فیبروبلاست که قبلا در محیط کشت حاوی 324 میلی مولار اتانل انکوبه شده و سپس در محیط فاقد الکل کشت داده شده و بعد از 48 ساعت مشاهده شدند
چپ: سلول های فیبروبلاست که در محیط 108میلی مولار اتانل انکوبه شده و سپس در محیط فاقد الکل کشت داده شده و بعد از 48 ساعت مشاهده گردیدند
(میکروسکوپ فاز معکوس-بزرگ نمایی 1000)

بحث و نتیجه‌گیری

به نظر می رسد تغذیه همراه با الکل می تواند عوارض سمی در بدن ایجاد کند و تغییرات گسترده‌ای در سلول های بدن بر جای گذارد،(19). بر اساس قانون شلفورد که در سال 1911 مطرح شد، شدت یک عامل اکولوژیک قادر است مرز و امکان رشد موجودات زنده را محدود کند، بنا بر این خیلی از مواد که در بدن تا حدی قابل تحمل هستند که اگر مقدار آن ها در بدن بیشتر از حد شود، برای بدن سم محسوب می شوند. گاهی این دامنه خیلی پایین است و در دوزهای پایین هم امکان ایجاد عوارضی در بدن وجود دارد. انتظار می رود ورود اتانل به بدن از طریق مواد غذایی، تبعاتی در پی داشته باشد، نه تنها الکل، بلکه ورود بسیاری از مواد در غلظت های بالا به بدن می توانند عوارضی در بدن ایجاد نمایند. در این راستا به منظور بررسی بقای سلول های فیبروبلاست انسانی اثر داده شده با اتانل، روش رنگ سنجی MTT به کار گرفته شد،(15). علت استفاده از این روش کم خطرتر و آسان تر بودن آن نسبت به روش های رادیواکتیو است. با توجه به شکل شماره 1 بقای سلول هایی که تحت اثر غلظت های مختلفی از اتانل واقع شده بودند تغییر پیدا کرد، به طوری که غلظت 54، 108 میلی مولار بیشترین مقدار کاهش بقا و در غلظت 216 و 432 میلی مولار کمترین تغییرات ثبت گردید. به علاوه در دوز 200 میلی مولار که منطبق با حداکثر غلظت پس از بسیار نوشیدن الکل در بدن است، تغییرات بقا به صورت معنی داری تغییر یافت. در شکل شماره 2 نیز تغییرات بقا در سلول های که قبلاً در محیط کشت حاوی اتانل انکوبه شده بودند و پس از 48 ساعت کشت مجدد در محیط فاقد اتانل متحمل تغییرات محسوسی بودند، بدین ترتیب که در غلظت های 216 و 324 میلی مولار افزایش بقا و در غلظت های دیگر به طور متوسط کاهش بقا دیده شد. مطالعات میکروسکوپی به منظور بررسی تغییرات مورفولوژیک و هم چنین تایید نتایج تست بقا صورت گرفت،(20)، که در این مطالعه از میکروسکوپ Invert استفاده شد. با توجه به اطلاعات به دست آمده از شکل شماره 3 مشاهده می شود که در غلظت 54 میلی مولار از اتانول بعد از مدت 48 ساعت انکوباسیون، اثرات بارزی را بر تغییرات شکل و مورفولوژی سلول های فیبروبلاست انسانی در مقایسه با نمونه نرمال وجود دارد. در واقع این تغییرات با کاهش جمعیت و تغییر شکل برخی از سلول ها از حالت دوکی به شکل کروی قابل مشاهده است. در شکل شماره 4 تغییرات مورفولوژیک و جمعیت سلول هایی که در غلظت های 108 و 324 میلی مولار اتانل انکوبه شده بودند و سپس در غیاب اتانل قرار گرفتند، مشخص است. در غلظت 324 میلی مولار جمعیت سلولی نسبت به سلول های نرمال به مقدار قابل توجهی افزایش و شکل سلولی به صورت کروی تغییر یافته است و در نمونه 108 میلی مولار نیز کاهش جمعیت و تغییرات مورفولوژیک

Archive of SID
www.SID.ir

قابل مشاهده است. بنا بر این با توجه به تغییرات بقا و غیرطبیعی بودن مورفـــولـــوژی در نسل های بعدی سلول های فیبروبلاست، این احتمال داده می شود که تغییراتی در سطوح ژنتیکی سلول ها پیش آمده باشد که در ایـــن راستا پیشنهاد می گردد، مطالعات در سطح بررسی های ژنتیکی از جمله کاریوتیپ صورت گیرد.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات پروتئومیکس به خاطر حمایت از اجرای این پروژه قدردانی می گردد.

References

1-Herrera DG, Yagüe AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, et al. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. Proceed Nat Acad Sci 2003;100: 7919-24.

2-Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science 1999;283:70-4.

3-Tsukamoto H, LU SC. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. FASEB J 2001;15:1335-49.

4-Mattson MP, Haddon RC, Rao AM. Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. J Mol Neurosci 2000;14:175-82.

5-Luo J, Miller MW. Platelet-derived growth factor-mediated signal transduction underlying astrocyte proliferation: site of ethanol action. J Neurosci 1999;19:10014-25.

6-Arnon R, Esposti SD, Zern MA. Molecular Biological Aspects of Alcohol- Induced Liver Disease. Clin Experimen Res 1995;19:247-56.

7-Carter EA, Wands JR. Ethanol inhibits hormone stimulated hepatocyte DNA synthesis. Biochem Bio Res Commun 1985; 128:767-74.

8-Coles CD. Prenatal alcohol exposure and human development. Brain Develop 2006; 4:123-42.

9-Peyman GA, Cheema R, Conway M, Fang T. Triamcinolone acetonide as an aid to visualization of the vitreous and the posterior hyaloid during pars plana vitrectomy. Retina 2000;20:554-5.

10-Belknap JK, Crabbe J. Young Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. Psychopharmacol 1993;122: 503-510.

11-Alves Jr AA, Andrade Filho L, Barbosa A, Bediaga I, Cernicchiaro G, Guerrer G, et al. The LHCb detector at the LHC. J Instrument 2008;3:11-8.

12-Oh JY, Yu JM, Ko JH. Analysis of ethanol effects on corneal epithelium. Invest Ophthalmol Visual sci 2013;28:205-211.

13-Amir S. Brain and liver aldehyde dehydrogenase: relations to ethanol consumption in Wistar rats. Neuropharmacol 1977;16: 781-4.

14-Todd E, Donald J, Marsh L, Marie L, Richard D. Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 1998;396:366-9.

15-Khatib H, Rezaei-Tavirani M, Heidari Keshel S, Zamanian Azodi M, Omidi R, Biglarian M, et al. Flow Cytometry Analysis of Rosa Damascena Effects on Gastric Cancer Cell Line (MKN45). Iranian J Can Prev 2013;6:30-6.

16-Zamanian-Azodi M, Rezaei Tavirani K, Mousavi M. Comparison between Physical and Enzymatic Methods. Cytomet 2013;8: 644-9.

17-Zamanian-Azodi M, Rezaie-Tavirani M, Heydari-Kashal S, Kalantari S, Dailian S, Zali H. Proteomics analysis of MKN45 cell line before and after treatment with Lavender aqueous extract. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2011;5:35-42.

18-Rezaie-Tavirani M, Fayazfar S, Heydari-Keshel S, Rezaee MB, Zamanian-Azodi M, Rezaei-Tavirani M, et al. Effect of essential oil of Rosa Damascena on human colon cancer cell line SW742. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2013;6:25-31.

19-Roodsari MR, Zamanian-Azodi M, Salimpour F. Herbal remedies and medicine; introducing some Iranian plants. J Paramed Sci 2013;4:498-108.

20-Dalilan S, Haidari kashl S, Zamanian Azodi M, Omidi R, Roeintan R, Hoseini R. The Evaluation of Lavender Aqueous Extract on Human Fibroblast Cells. HBI J 2013;21:143-9.

Archive of SID
www.SID.ir

The Evaluation of Ethanol Effects on Fibroblast Cells Viability

Aminigram P[1], Heydari keshel S[2], Zamanian Azodi M[2], Rezaei tavirani M[3], Basati Gh[4], Rezaei tavirani M[2]*

(Received: 26 Dec. 2012 Accepted: 3 Jun. 2013)

Abstract

Introduction: Ethanol known as ethyl alcohol is a volatile, flammable, colorless liquid. It is primarily known as the type of alcohol found in alcoholic beverages. Its consumption is very high around the world. It has been reported that ethanol intake is associated with different diseases. Therefore, here in this study the effect of ethanol on human fibroblast cells was investigated.

Materials & Methods: We have carried out cell survival and morphologic studies via Invert Microscope and MTT assay methods to evaluate survival rate and morphological alterations of human fibroblast cells treated with different concentrations of alcohol.

Findings: Our findings suggested that ethanol could possibly change human fibroblast cells morphology and survival rate after 48 h incubation. In addition to this, examining fibroblast cells after 48 h culturing without ethanol showed the maintenance of these changes in next generation of the cells.

Discussion & Conclusion: It can be concluded that ethanol can possibly cause genetic alterations of the human fibroblast cells, so karyotype evaluations is required to determine these consequences.

Keywords: ethanol, fibroblast, MTT assay, morphologic studies

1. Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
4. Dept of Clinical Biochemistry, Faculty of Allied Medical Sciences, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
** (corresponding author)*

Archive of SID

www.SID.ir