

تأثیر تپ بر نقش آلبومین سرم انسانی در تأمین فشار اسمزی خون

سید محمد مهدوی^۱، مهرناز مصطفوی^۱، دکتر مصطفی رضایی طاویرانی^۲، دکتر کورش ساکی^۳، دکتر سید حسن مقدمنیا^۴، سفیری حسن پور^۵، لیلا صالحی^۶، بیژن رنجبر^۷، دکتر یوسف پورخوشبخت^۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۳/۰۵/۱۱

تاریخ دریافت: مهرماه ۱۳۸۳

چکیده

مقدمه: آلبومین سرم انسانی (HSA) پروتئینی است تک زنجیره‌ای با ۵۸۵ اسید آمینه و وزن مولکولی ۶۷/۵ kD می‌باشد که نقش مهمی در حمل اسیدهای چرب، داروها، هورمونها و کاتیون‌های مختلف در خون به عهده دارد. HSA به تنها ۲۰٪ و با کمک کاتیون‌های همراه آن تا ۸۰٪ فشار اسمزی خون را تأمین می‌کند. در این مطالعه به منظور بررسی اثر تپ در تأمین فشار اسمزی خون توسط آلبومین بر همکنش آلبومین، ماده فعال سطحی در دماهای موردنظر مطالعه شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی تغییر فاز آلبومین سرم انسانی در دماهای ۲۵°C و ۴۵°C در بافر فسفات ۱۰ mM و pH=۷ در حضور غلظت‌های مختلف سدیم دودسیل سولفات (SDS) از طریق اسپکتروسکوپی مطالعه شد. محاسبات انجام شده براساس روابط فیزیکی شیمیایی موجود در منابع ذکر شده انجام گرفت. هر آزمایش سه بار تکرار و میانگین آن گزارش شد.

یافته‌های پژوهش: نتایج نشان داد که آلبومین در دماهای ۳۵°C و ۴۵°C در مجاورت SDS طی سه مرحله (I تا III) تغییر فاز می‌دهد که مرحله III تغییر فاز در هر دو دما از نظر ترمودینامیکی دارای پایداری یکسانی می‌باشد. اما مرحله I و II تغییر فاز برای دماهای ۲۵°C و ۴۵°C دارای پایداری متفاوتی می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی: برهمکنش HSA-SDS در ۲۵°C و ۴۵°C ناشی از برهمکنش‌های الکترواستاتیکی است. زیرا مراحل I و II تغییر فاز در ناحیه برهمکنش‌های الکترواستاتیکی واقع شده است و ساختار HSA در ۴۵°C به علت تضعیف برهمکنش‌های الکترواستاتیکی ناپایدارتر از ۲۵°C است. بنابراین در حالت تپ (افزایش دمای بدن از ۳۷°C به ۴۲°C) چگالی بارسطحی آلبومین و نقش آن در تأمین فشار اسمزی کاهش می‌یابد و با افزایش میزان ادرار نقش مهمی را در کاهش دمای بدن بر عهده می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: آلبومین سرم انسانی، سدیم دودسیل سولفات، طیف سنجی، تپ

Email:

- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات
- استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی، نویسنده مسؤول tavirany@yahoo.com
- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی
- دانشجوی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی
- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی(بیوفیزیک)
- استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی

مقدمه

HSA مطالعات اخیر نشان داده است که در دامنه دمایی قبل از دناتوراسیون دچار تغییر فاز می‌شود که

نقشه عطف این تغییر فاز در 42°C است ($27, 28$). در این مطالعه ساختار آلبومین سرم انسانی قبل از تغییر فاز و بعد از تغییر فاز به ترتیب در دماهای 25°C و 45°C با استفاده از برهمکنش SDS با HSA از طریق طیفسنجی مطالعه می‌شود. اهمیت این بررسی در نشان دادن نقش مهم آلبومین در هنگام تپ با کاهش فشار اسمزی خون و نهایتاً دفع بیشتر ادرار است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۳ صورت گرفت. آلبومین سرم انسانی از شرکت سیگما^۱ خریداری و سدیم دودسیل سولفات و نمک‌های فسفات با درجه خلوص آنالیتیکی از شرکت مرک^۲ تهیه شد. از بافر سدیم 10 mM و $\text{pH}=7$ در کلیه آزمایشات استفاده گردید. دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل شیمادوز ۳۱۰۰ ژاپنی با بافر فسفات در طول موج 280 nm صفر شد. جذب محلول 2 mg/ml از آلبومین سرم انسانی در 25°C 25 اندازه‌گیری شد. با افزایش مقادیر موردنظر از SDS به یک نسبت به بافر و نمونه پروتئین، جذب آلبومین در حضور غلظت‌های مختلف SDS بدست آمد. به منظور جلوگیری از هرگونه خطای سینتیکی حضور آلبومین در مجاورت SDS (انکوباسیون) به مدت 5 دقیقه برای همه نمونه‌ها انجام شد.

آزمایش در دمای 45°C به روش ذکر شده برای 25°C نیز انجام شد. تغییرات جذب آلبومین در 280 nm به عنوان تابعی از غلظت SDS ترسیم و خطوط قبیل و بعد از تغییر فاز به صورت مماس‌های خطی در

آلبومن سرم انسانی^۳ پروتئینی تک زنجیره‌ای است که شامل 585 اسید آمینه و وزن مولکولی آن $67/5$ کیلو Dalton HSA می‌باشد (۱). ساختار سه بعدی HSA شامل سه دمین است که هر دمین آن نیز دو زیردمین دارد (۲-۴). وظیفه عمده HSA تأمین فشار اسمزی خون و جابجایی مواد مختلفی از قبیل فلزاتی مانند مس، روی، کبالت و کلسیم، اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، هورمون‌ها و طیف وسیعی از داروها و می‌باشد (۵-۱۶). HSA به تنها ۳۰٪ از فشار اسمزی خون را تأمین می‌کند. کاتیون‌های اطراف HSA نیز 50% فشار اسمزی خون را ایجاد می‌کند. بنابراین در مجموع HSA تأمین 80% فشار اسمزی خون را برعهده دارد (۷). سطح مولکول HSA در pH فیزیولوژیک حاوی تعدادی بار الکتریکی منفی است که این بارها به علت پدیده دونان جمع کثیری از کاتیون‌های نک طرفیتی را در اطراف HSA جمع و غیرقابل نفوذ از رگ می‌نماید (۸). برهمکنش فلزات مختلف از جمله جیوه، نقره، برخی اسیدهای آمینه و برخی قندها از جمله گلوكز و گالاكتوز با HSA به روش‌های مختلف مطالعه شده است (۹-۲۵). از جمله مطالعات انجام شده با استفاده از سدیم دودسیل سولفات^۴ می‌توان به بررسی‌های ساختاری آلبومین اشاره کرد که نشان می‌دهد آلبومین در حضور SDS قبل از دناتوراسیون تغییر فاز می‌دهد، این عمل ناشی از برهمکنش‌های الکترواستاتیکی است (۲۶).

-
- 1.HSA
 - 2.SDS
 - 3.Sigma
 - 4.Merck

دودسیل سولفات در طول موج ۲۸۰ nm در دماهای ۳۵°C و ۴۵°C در شکل (۱) نشان داده شده است. نمودارهای ۳۵°C و ۴۵°C هر کدام شامل ۳ مرحله (که با علائم I و II و III) مشخص شدند. مقادیر $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ بدست آمده از شکل های (۵-V) و (۱/۳) SDS (۲۲) بدست آمده از شکلهای مذکور برای تغییر فازهای III تا I دو دمای ۳۵°C و ۴۵°C در جدول (۱) درج شده است.

ناحیه قبیل و پایان تغییر فاز ترسیم شد و با استفاده از فرض دو حالته (۲۹) کسر دناتوره، ثابت تعادل و مقدار ΔG° (۳۰) و (۳۱) در غلظت‌های مختلف SDS محاسبه گردید.

یافته‌های پژوهش
نمودار تغییرات جذب آلبومین سرم انسانی در حضور غلظت‌های مختلف ماده فعال سطحی آنیونی سدیم

شكل ۱: جذب آلبومین در دماهای ۳۵°C و ۴۵°C در طول موج‌های مختلف

شكل ۲: تغییرات ΔG° برای فاز اغیرطبیعی شدن آلبومین در اثر برهmeknits با SDS و محاسبه از طریق برون یابی نمودار به غلظت صفر SDS $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$

شکل ۳:

شکل ۴:

جدول ۱. مقادیر $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ و $1/2$ (SDS) برای مراحل سه کانه تغییر فاز آلبومین سرم انسانی ناشی از برهmeknیش HSA با SDS در بافر فسفات 10mM در دماهای 25°C و 40°C

فاز III	فاز II	فاز ا	فاز
۹۰	۳۴	۱۹/۵	25°C
۹۰	۲۸	۲۳	40°C
۱/۰۲	۰/۸۵	۰/۴۸	25°C
۱/۰۲	۰/۸۱	۰/۳	40°C
			$\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ k.J/mol
			[SDS] 1/2 mM

نadarد و مرحله III تغییر فاز در هر دو دمای 25°C و 40°C تا حدود زیادی همپوشانی دارد. میتوان حالت آلبومین در خاتمه مرحله III را حالت غیرطبیعی مولکول فرض کرد و بنابراین مدل زیر را در خصوص تغییر فاز آلبومین ارایه داد.

که N , I_1 , I_2 , D به ترتیب حالت‌های طبیعی، حد واسط اول، حد واسط دوم و حالت غیرطبیعی آلبومین میباشند.
 به منظور مقایسه دقیق مراحل تغییر فاز در دماهای 25°C و 40°C ، ΔG° ، این مراحل به عنوان تابعی از SDS در شکل‌های ۲ تا ۴ رسم شده است. یکی از پارامترهای مهم در مقایسه پایداری یک مولکول در شرایط مختلف، مقایسه $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ آن مولکول در شرایط مورد بحث میباشد (۳۲). در شکل‌های (۲ تا ۴) با برونیابی ΔG° تغییر فاز به غلظت صفر SDS مقادیر مختلف $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ برای مراحل سه کانه تغییر فاز آلبومین در 25°C و 40°C تعیین شده است. مقادیر $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ و غلظت $1/2$ [SDS] (که در این غلظت از SDS نصف مولکولها در مرحله موردنظر تغییر فاز داده‌اند و بنابراین $K=1$ و $\Delta G^{\circ}=0$ میباشد. مقادیر $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ و $1/2$ [SDS] برای مرحله III تغییر فاز در دماهای 25°C و 40°C یکسان است. با توجه به جدول ۱ مقادیر $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ برای مراحل I و II تعیین

بحث و نتیجه‌گیری

تغییر فاز آلبومین ناشی از برهmeknیش HSA با SDS در سه مرحله (که با علائم I، II و III مشخص شده بودند) صورت گرفت که دو مرحله نخست تغییر فاز با کاهش جذب و مرحله سوم با افزایش جذب همراه بود. یافته‌های موجود در خصوص برهmeknیش‌های SDS با پروتئینها (۳۳) نشان داد که SDS طی چند مرحله با پروتئین برهmeknیش می‌دهد که در مرحله اول اتصال از نوع برهmeknیش الکترواستاتیکی است و پس از اشباع جایگاه‌هایی باردار الکتریکی برهmeknیش‌های آبگریز انجام می‌گیرند، بنابراین به نظر می‌رسد که دو مرحله تغییر فاز آلبومین (I و II) که توأم با کاهش جذب نور می‌باشد ناشی از اثر الکترواستاتیکی برهmeknیش SDS با HSA باشد. در مرحله برهmekنیش‌های آبگریز که مولکول معمولاً دناتوره می‌شود و بخش چرب (هیدروفوب) مولکول در معرض بافر قرار می‌گیرد با تغییر فاز به علت در دست قرار گرفتن گروههای جاذب نور (کروموفورها) که از بطن به سطح می‌آیند جذب نور افزایش می‌یابد (۳۴) که این ویژگی را می‌توان در مرحله III تغییر فاز مشاهده کرد. با توجه به شکل ۱ تعداد مراحل تغییر فاز در دماهای 25°C و 40°C برای آلبومین یکسان و برابر ۲ می‌باشد. بنابراین تغییر دما از 25°C به 40°C تأثیری بر تعداد مراحل تغییر فاز

می باشد(۱۷). عدم پایداری جزئی HSA در 45°C نسبت به 35°C سبب می شود بطور جزئی بخش های چرب درون مولکول در 45°C در معرض حلال قرار گیرند که می تواند همراه با افزایش حجم و سطح مولکول باشد و به همین علت چگالی بار سطحی منفی HSA سبب تعییر یافته و کاسته می شود. کاهش چگالی بار سطحی منفی HSA سبب کاهش نقش کاتیونهای اطراف آن در تأمین فشار اسمزی خون می شود. و در نتیجه دفع کلیوی آب (میزان ادرار) هنگام تپ (افزایش دمای بدن به 42°C) افزایش می یابد. با توجه به طرفیت گرمایی بالای آب و افزایش میزان ادرار هنگام تپ می توان نتیجه گرفت که تغییر ساختار HSA هنگام تپ راه مؤثری در کاهش دمای بدن (یا جلوگیری از افزایش دمای بدن) می باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهری بهشتی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلام در حمایت از انجام این تحقیق سپاسگزاری می شود.

فاز در دماهای 35°C و 45°C متفاوت است، بطوری که مقدار ΔG_{H2O}° در 35°C برای مجموع فازهای I و II، k.J.mol^{-1} ۲/۵ بیشتر از مقدار آن برای مراحل تغییر فاز I و II در 45°C است. از طرفی [SDS] مربوط به مراحل I و II تغییر فاز آلبومین در 35°C بیشتر از مقادیر مشابه در 45°C است. می توان چنین نتیجه گرفت که مراحل I و II تغییر فاز HSA در 35°C به انرژی و SDS بیشتری نیاز دارد و یا به عبارتی آلبومین در این وضعیت پایداری بیشتری از خود نشان می دهد. با وجود پایداری کلی HSA در 35°C نسبت به 45°C مقایسه فازهای I در دو دما نشان می دهد که فاز I 45°C پایدارتر از 35°C است. بنابراین HSA برهمکنش الکترواستاتیکی SDS با یک روند پیچیده و چند مرحله ای است که در مجموع نشان می دهد HSA در 35°C ناپایدارتر از 35°C است.

آلبومن سرم انسانی در 35°C پایدارتر از 45°C است و این پایداری ناشی از برهمکنشهای الکترواستاتیک می باشد. نقش HSA در تأمین فشار اسمزی خون 30% بخاطر خود مولکول HSA و 50% نیز ناشی از کاتیونهای اطراف HAS

منابع

- ۱- مقدم نیا، سید حسن؛ رضایی طاویرانی، مصطفی؛ رنجبر، بیژن؛ گلزاری، سوسن؛ خزاعی، معصومه؛ امامی، مجتبی؛ موسوی موحدی، علی اکبر. حد واسط جدید در ساختار آلبومین سرم انسانی در اثر ایجاد تپ، فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهری بهشتی، علوم پیراپزشکی. ۱/۳ پاییز ۱۳۸۳؛ ۱۱۸-۱۱۳.
- ۲- رضایی طاویرانی، مصطفی؛ موسوی موحدی، علی اکبر. آنالیز ساختاری هموگلوبین کوتр توسط مواد سطحی فعال، فصلنامه مجله زیست شناسی ایران، ۱/۱ زمستان ۱۳۷۴؛ ۳۵-۳۶.
- ۳- رضایی طاویرانی، مصطفی؛ یوسفی، رضا؛ رنجبر، بیژن؛ نادری منش، حسن. بیوفیزیک، چاپ دوم، تهران: انتشارات سنجش تکمیلی، چاپ ۱۳۸۴.

4. Brown J.R. Serum albumin; amino acid sequence. In albumin structure function and uses (Rosenore V. M., Oratz M. and Rothschild M.A., editors). Pergamon. Oxford 1977: 27-51.
5. Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Crystal structure of human serum albumin at 2.54 resolution. Protecin eng. 1999: 12 439-446.
6. Wallevick K. reversible denaturation of human serum albumin by ph. Temperature, and guanidine hydrochloride followed by optieal rotation dispersion. J. Biol. Chem. 1973. 248: 2650-2655. 3 Wallevick K. Reverible- denaturation.
7. Chmelik J., Kalous V, polarographic investigation of conformational changes of human serum albumin. Part I. Unfolding of human albumin by urca. Bioelectrochem. Bioenerg. 1982: 9: 7-13.
8. Carter D., He X., Min., Structure of serum albumin. Adv, protectein Chem, 1992: 45: 153-203.
9. Kasai- Morie T., Horie T., Awazu S. Influcence of the N-13 transition of human serum albumin on the stracture of the warfarin- binding site Biochem. Biophys. Acta 1987. 915: 277-283.
10. Porter D.J. Binding of 2-acetylpyridine- 5-[12- chloroanilino thiocarbonyl] thiocarbon hydrazone (Bw 348u87) to human serum albumin. Biochem. pharmacol. 1992: 44: 1417-1429.
11. Edeard F.B. Rombauer R.B., Campbell B.J Thioldisulfide interchange reactions between serum albumin and disulfides. Biochem. Biophys. Acta. 1969: 194: 234-245.
12. Dixon J.W., Sarkar B. Isolation, amino acid sequence and copocr(11)- biniding properties of peptide (1-24) of dog serum albumin J, Biol. Chem 1974: 249: 5872-5877.
13. Jenkians B.G.: Lanffer R.B. Detection of site- specific binding and cobinding of lighands to human serum albumin using ¹⁹ F NMR, Mol. Pharmacol. 1990: 37: 111-118.
14. Finotti P., Pagetta A. Heparin- induced structural modifications and oxidative cleavage of humsn serum albumin in the absenee and presence of glucose- implications for transcapillary: leakage of albumin in hyperglycaemia, Eur. J. Biochem. 1997: 247: 1000-1008.
15. Liang H., Huang J., Tu C.Q.. et al. The subsequent effect of interaction between Co ²¹ and human serum albumin or bovine serum albumin. J. Inore. Biochem., 2001: 85: 167-171.

16. Kragh- Hansen U., Brennan S.O. Minchiotti I. et al. Modified high affinity binding of Ni^{2+} Ca^{2+} and Zn^{2+} to natural mutants of human serum albumin and proalbumin. Biochem, J., 1994: 301: 217-223.
17. Saboury A.A.. Shamesaei A.A. Mossavi- Movahedi A.A., et al. Thermodynamics of binding 2,2- bipyridylglycinato palladium (II) chloride on human serum albumin.,J. Chin. Chem. Soc. 1999: 46: 917-922.
18. Bos O.J., Fischers M.J., Fischer M.J., Wilting J., et al. Mechanism by which warfarin binds to human serum albumin stopped- flow kinetic experiments with two large fragments of albumin. Biochem. pharmacol. 1989-1984.
19. Bos O.J., Remijn J. P. Fischer M. J., et al. Isolation and characterization of the warfarin binding site of human serum albumin. A comparative study of two large fragments? Biochem. Pharmacol 1988: 37: 3904-3909.
20. Figger J., Rossing T.H., Fenel V. The role of serum proteinins in acid- base equilibria J. Lab. Clin. Med. 1991: 117- 453-467.
21. Berne R.M., Levy M.N., editors Berne R.M., Levey M.N. Principles of physiology. 2th ed. Baltimore: mosby. Cardiovascular system. Part IV: 1996.
22. Mohamadi- Nejad A., Moosavi- Movahedi A.A., Hakimelahi J.I. and Sheibani N, Binding analysis of human serum albumin and Glucose: Specific interactions in to the diabetic range of glucose concentration. The int J, Biochem. and cell boil. 2002: 34(9): 1115-1124.
23. Lassac J.P.. Sarkar B, Characterization of the copper(II)- and nickel(II)- transport site of human serum albumin. Studies copper(II) and nickel(II) binding to peptide 1-24 of human serum albumin by ^{13}C and ^{11}NMR spectroscopy. Biochemistry. 1984: 23: 2832-2838.
24. Peters T, J. r. Feldhoff R.C. Fragment of bovine serum albumin produced by limited proteolysis. Isolation and characterization of tryptic fragments. Biochemistry. 1975: 14: 3384-3391.
25. King T.P. On the sulphydryl group of human plasma albumin J, Biol Chem. 1961: 236: PCP.
26. Anderson L.Q The heterogeneity of bovine serum albumin Biochem. Biophys. Acta, 1991: 117.
27. Urbanowski J.C., Cohenfold M, A., Dain J.A. Non-enzymatic galactosylation of human serum albumin. In vitro preparation J.Biol Chem. 1982: 257: 111-115.

28. Yamasaki M., Yano H., Aoki K., Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin. In vitro preparation. *J. Biol. Chem.* 1982;257: 111-115.
29. Saboury A.A., Hosseini- Kashani F., Rezaei- Tavirani M., Ranjbar B., Thermodynamic studies on the interaction of nickel with human serum albumin. *Prog. Biochem. Biophys* 2003; 30(5): 732-737.
30. Pace C.N. Measuring and increasing protein stability, *TIB Tech*, 1999; 80: 93-98.
31. Pace C.N. Denaturation and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods in enzymology*. 1986; 131-266-270.
32. Rezaei- Tavirani M., Mossavi- Movahedi A.A., Saboury A.A., Hakimelahi G.H., Ranjbar B., Hasoindokht M.R. Termodynamic domain analysis of fresh and heat-treated human apotransferrin. *Termochimica acta* 2000, 383: 108-113.
33. Nazari K., Saboury A.A., Mosavi- Movahedi A.A. Enthalpy investigation for elucidation of the transition concentration for the interaction of horse radish peroxidase with surfactant. *Termochimica acta* 1997; 302: 131- 135.
34. MOsavi- Movahedi A.A Nazari K., Saboury A.A. Denaturation of horse radish peroxidase with SDS and DTAB. *Colloids and surfaces* 1997, 9: 123-130.

The effect of fever on the role of human serum albumin on the blood pressure

S.M. Mahdavi¹, M. Rezaei-Tavirani², S.H. Moghaddamnia³, K. Saki², S. Hassanpour², L. Salahi², B. Ranjbar⁴, Y. PourKhoshbakht³, M. Mostafavi¹

Introduction: Serum albumin (HSA) is a single strand protein, MW = 67.5 kD including 585 amino acid . Its main role in blood is regulation of blood osmotic pressure. It carries some metabolites and drugs in blood.

Materials and methods: In this paper the effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) as an anionic surfactant on the function of HSA at the physiological and pathological temperatures (35°C and 45°C) is studied via spectroscopic method .

Results and discussion: The results indicate that SDS-HSA interaction is a three steps process including phases I – III. The phase III for tow temperatures is similar but the others are different. SDS in the low concentration interacts with proteins by electrostatic fashion. Therefore it seems that the pathological temperatures effects on the electrostatic properties of HSA. This effect alters the surface charges of HSA and leads to the reduction of the role of HSA in the providing of blood osmotic pressure at the pathological temperatures.

Conclusion: Fever causes the conformational change for HSA that leads to the reduction of body temperature.

Keywords: Human serum albumin, sodium dodecyl sulfate, spectroscopy, fever

1. Center of Science and Researches, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Medicine faculty, Ilam medical University, Ilam, Iran

3. Faculty of Paramedical Science, Shaheed Beheshti medical University, Tehran, Iran

4. Faculty of Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.