

اثر محافظتی روی در جلوگیری از سمیت اتانول بر حیات سلول‌های سرتولی موشی در شرایط *in vitro*

نازیلا پورحسنعلی^۱، مریم پورحیدر^۲، فاطمه خردمند^۳، مرتضی متذکر^۴، شیوا روشن میلانی^۵

تاریخ دریافت 1393/07/18 تاریخ پذیرش 1393/10/14

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: اتانول دارای اثرات همه‌جانبه سمی بر عملکرد تولیدمثلی مرد می‌باشد و به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم مراحل اسپرماتوزن را مختل می‌سازد. آنتی‌اکسیدانت روی، اثرات سمی اتانول را در سلول‌های غیرجنسی کاهش می‌دهد. باین‌حال مکانیسم دقیق اثر اتانول و روی بر ظرفیت تولیدمثلی بخصوص بر سلول‌های سوماتیک بیضه‌ای ناشناخته می‌باشد. مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثرات تنها و توأم اتانول و روی بر میزان حیات سلولی و مورفولوژی کشت سلول‌های سرتولی انجام شده است.

روش کار: سلول‌های سرتولی موشی بعد از طی مراحل کشت در چهار گروه اصلی شامل: اتانول (۱۶۰ mM)، روی (۸ μM)، پیش‌درمانی و کنترل، به مدت ۲۴ یا ۴۸ ساعت با محیط کشت حاوی تیمار مربوطه مواجهه یافتند. در گروه پیش‌درمانی، سلول‌ها ابتدا با روی و سپس با اتانول و در گروه کنترل، فقط با محیط کشت کامل مواجهه شدند. سپس میزان حیات سلولی با روش MTT و تغییرات مورفولوژیکی توسط میکروسکوپ معکوس بررسی شدند.

نتایج: در گروه اتانول کاهش معنی‌دار در میزان حیات سلولی و تغییرات مورفولوژیکی در مقایسه با سایر گروه‌ها دیده شد. میزان حیات سلولی در گروه روی در مقایسه با سایر گروه‌ها و حتی کنترل افزایش یافت. در گروه پیش‌درمانی، میزان حیات سلولی نسبت به گروه روی کاهش ولی نسبت به اتانول افزایش معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: روی، اثرات اتانول در کاهش میزان زیست‌پذیری سلول‌های سرتولی را تخفیف می‌دهد. روی ممکن است از ایجاد مرگ سلولی خود به خودی یا پاتولوژیک در سلول‌های جنسی پیشگیری نماید و یک اهمیت بالینی در ناباروری و الکلیسم داشته باشد.

کلمات کلیدی: حیات سلولی، سلول سرتولی، اتانول، روی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره دوازدهم، ص 1091-1082، اسفند 1393

آدرس مکاتبه: ارومیه، جاده سرو، پردیس نازلو دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی - تلفن: ۰۹۱۴۴۴۷۷۹۵۴

Email: milani@umsu.ac.ir

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی در دانشگاه علوم پزشکی ارومیه بوده است.

مقدمه

تشریحی - فیزیولوژیک تا عوامل محیطی و اکتسابی را شامل شود. مهم‌ترین عوامل محیطی تأثیرگذار بر سیستم تولیدمثلی شامل استرس، بیماری، چاقی، سموم و آفت‌کش‌ها، اشعه، سیگار و اتانول می‌باشند (۴-۷). به نظر می‌رسد در این میان مصرف اتانول به‌عنوان سومین ریسک فاکتور بعد از سیگار و فشارخون بالا که منجر به بیماری‌های مختلف در افراد می‌شوند (۸)، دارای اثرات همه‌جانبه بر عملکرد تولیدمثلی باشد که می‌تواند اثرات خود را به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم آشکار سازد (۹).

ناباروری به ناتوانی یک زوج در باردارشدن پس از یک سال رابطه جنسی بدون استفاده از وسایل پیشگیری اطلاق می‌شود که حدود ۸-۱۲ درصد زوجین را درگیر می‌سازد (۱). علت ناباروری در بیش از ۴۰ درصد زوجین مربوط به مردان، در حدود ۴۰ درصد مربوط به زنان، در ۱۰ درصد به هر دو جنس و در حدود ۱۰ درصد از زوجین نامشخص است (۲،۳). عواملی که باعث ناباروری می‌شوند بسیار متعدد و مختلف هستند که می‌تواند طیفی از علل

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۲ کارشناس ارشد بافت‌شناسی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۳ استادیار گروه بیوشیمی، مرکز سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۴ دانشیار گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۵ دانشیار گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

بوده‌اند (۱۷). مطالعاتی که به‌طور اختصاصی به بررسی اثرات اتانول روی کشت سلول‌های سرتولی، از منظر بررسی میزان حیات سلولی و مکانیسم‌های درگیر در آن، بپردازند بسیار محدود بوده‌اند. از آنجائی که عملکرد سلول‌های سرتولی به‌طور مستقیم و غیرمستقیم روی تولید اسپرم و فرایند اسپرماتوزن اثر می‌گذارد، به نظر می‌رسد که برای پی بردن به مکانیسم اثر اتانول در ناباروری بررسی تأثیر آن روی سلول‌های سوماتیک بیضه‌ای مانند سلول‌های سرتولی مفید و ضروری باشد. از سوی دیگر، اثرات سمیت زدایی روی در جلوگیری و یا تخفیف عوارض ناشی از اتانول بر سلول‌های جنسی و سوماتیک بیضه‌ای بررسی نشده است؛ بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی اثرات اتانول بر مورفولوژی و میزان حیات سلولی کشت سلول‌های سرتولی (TM4) و نقش محافظتی احتمالی روی صورت گرفته است.

مواد و روش کار

- کشت سلول:

سلول‌های سرتولی موشی (TM4, Mus Musculus) از بانک سلولی وابسته به انیستیتو پاستور ایران تهیه شده و بر اساس پروتکل کلکسیون سلول‌های بنیادی^۱ در محیط کشت DMEM/F12/Hepes حاوی ۲/۵ درصد سرم جنینی گاو و ۵ درصد سرم آسیبی و ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین در فلاسک ۲۵ ml CO₂ کشت داده شده، در انکوباتور با میزان رطوبت ۹۵ درصد، ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه قرار گرفته و هر ۲۴ ساعت تعویض محیط می‌شدند. بعد از همپوشانی حدود ۸۰-۱۰۰ درصد سطح فلاسک، پاساژ سلول‌ها با محلول تریپسین X صورت می‌گرفت. برای بهینه سازی و انتقال تعداد معینی از سلول‌ها به پلیت، ابتدا درصد سلول‌های زنده با رنگ تریپان بلو تعیین و شمارش سلول‌ها با کمک لام نئوبار صورت می‌گرفت و ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای ته صاف منتقل می‌شد. طی یک سری آزمایشات مقدماتی، تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ mM Ethanol for molecular biology, Merck, (Germany) برای اتانول و با غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ برای روی (Sigma, Zink Sulphate) اهدائی خانم دکتر خردمند، در دو زمان مواجهه ۲۴ و ۴۸ ساعته صورت گرفت. بعد از انجام MTT^۲ اولیه، داده‌ها مورد بررسی آماری قرار گرفتند تا از نظر معنی‌داری در غلظت‌ها و زمانهای مختلف بررسی شوند. بدین ترتیب غلظت مناسب (IC₅₀) برای اتانول و غلظتی که در آن سلول‌ها بیشترین

بسیاری از افراد از آسیب‌هایی که مصرف اتانول در دوره بارداری بر جنین وارد می‌کند آگاه‌اند اما بسیاری از زوجین باور ندارند که مصرف اتانول بتواند قدرت باروری آن‌ها را مختل کند و اثرات غیرقابل‌جبران در باروری ایجاد نماید. مصرف اتانول می‌تواند باعث تغییرات مورفولوژیکی و فیزیوپاتولوژیک از جمله هیپوگنادیسم و اختلالات ترشچی - هورمونی شود که حاکی از اثرات سمی pantesticular آن می‌باشد (۵، ۱۰-۱۳). علی‌رغم گزارشات متعدد و مکرر در مورد اثرات سوء اتانول بر روی سیستم تولیدمثل و قدرت باروری، مطالعات ضدونقیضی در خصوص تأثیر و یا عدم تأثیر آن وجود دارند (۱۴-۱۵) که اثر اتانول روی باروری را در حاله‌ای از ابهام قرار می‌دهند. با این وجود، اکثر مطالعات گذشته درجاتی از اختلال در باروری ناشی از مواجهه با اتانول را در هر دو جنس و خصوصاً در جنس مذکر با غالبیت اثر در فرایند اسپرماتوزن گزارش کرده‌اند (۱۰، ۱۲، ۱۶-۱۷). این مطالعات نشان داده‌اند که رژیم طولانی‌مدت غنی از اتانول و یا تزریق حاد و مستقیم اتانول به داخل بیضه باعث افزایش آپوپتوز در سلول‌های زایا، اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت شده است (۱۸، ۱۹، ۱۲). آپوپتوز ناشی از اتانول نه تنها بیضه، بلکه طیف وسیعی از سایر سلول‌های بدن را، با میزان بروزی متفاوت (۲۰) و با مکانیسم‌های وابسته به استرس اکسیداتیو، تومور نکروز فاکتور (TNF)، پروتئین‌های کاسپاز و Fas ligand درگیر می‌سازد (۲۱، ۱۸). بر اساس مطالعات انسانی و حیوانی گزارش شده، اتانول باعث ایجاد آپوپتوز در فیبروبلاست‌ها، CNS (خصوصاً در هیپوتالاموس و هیپوکمپ)، پروستات، کبد و به‌طور کلی در سلول‌های اپی‌تلیال بیشتر بافت‌های بدن و آندوتلیال عروق خونی می‌شود (۲۰). در بعضی از مطالعات ثابت شده است که اثرات آپوپتوتیکی ناشی از اتانول توسط انواعی از آنتی‌اکسیدانت‌ها از جمله روی (ZN) قابل برگشت بوده است (۲۲، ۲۳). در مطالعه‌ای که آپوپتوز کبدی در موش صحرائی مورد مطالعه قرار گرفته است، مصرف روی باعث مهار آپوپتوز ایجاد شده توسط اتانول از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیم آنتی‌اکسیداتیو وابسته به کاسپاز ۸ و ۹ (۲۲) و از طریق مکانیسم‌های وابسته به Fas ligand و TNF (۲۳) شده است.

در این میان مطالعات محدودی به بررسی In Vitro اثرات اتانول بخصوص بر روی سلول‌های سوماتیک بیضه (سلول‌های بافت پشتیبیان: سرتولی و لیدیگ) از نقطه نظر تأثیر بر میزان حیات و زیست پذیری آن‌ها پرداخته‌اند. در مطالعه‌ای که به بررسی اثر اتانول روی کشت سلول‌های لیدیگ موشی پرداخته‌اند، افزایش میزان آپوپتوز از طریق مکانیسم وابسته به bax depended و کاسپاز ۳ گزارش شده است (۲۴). با وجود اینکه سلول‌های سرتولی اولین سلول‌های بیضه‌ای در نشان دادن اثرات سمی اتانول

¹ American Type Culture Collection.

² (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

پلیت صاف ۹۶ خانه‌ای ارزیابی شدند. میانگین حاصل از دو بررسی متفاوت در ۸ زمینه مختلف به صورت تصادفی به عنوان داده اصلی مد نظر قرار گرفت. گروه‌های مورد مطالعه از نظر اثرات القا شده توسط اتانول و روی با یکدیگر و با گروه کنترل مقایسه شدند.

- بررسی آماری:

تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار GraphPad InStat نسخه 3.05 صورت گرفت. برای بررسی نوع توزیع داده‌ها از تست Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. به علت نرمال بودن توزیع داده‌ها از تست‌های پارامتریک استفاده شد. میانگین داده‌های حاصل از ۵ چاهک برای هر غلظت/زمان مورد آنالیز آماری قرار گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها بین دو گروه، از آزمون Independent- samples (t-test) و برای مقایسه میانگین داده‌های گروه‌های مختلف، از آزمون ANOVA یک طرفه استفاده شد. برای تصمیم‌گیری در مورد معنی‌داری ارتباطات بررسی شده، $p \leq 0.05$ ملاک قضاوت قرار گرفت و نتایج بر اساس میانگین \pm خطای معیار نشان داده شد. در آنالیز آماری مربوط به بررسی مورفولوژی بعد از ارزیابی و محاسبه score در هر نمونه کشت، آنالیز آماری توسط نرم‌افزار SPSS 17 و توسط آزمون ANOVA و تست Tukey صورت گرفت.

یافته‌ها

- میزان حیات سلولی در گروه‌های مواجهه با اتانول، روی و پیش‌درمانی:

بررسی میزان حیات سلولی کشت سلول‌های سرتولی (TM4) توسط روش MTT صورت گرفت. برای این منظور سلول‌های سرتولی بعد از طی مراحل کشت سلولی، با غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ اتانول به مدت ۲۴ یا ۴۸ ساعت مواجهه شدند. بعد از انجام MTT، آنالیز آماری بیانگر روند کاهشی میزان حیات سلولی در تمامی گروه‌های دریافت کننده اتانول بود ولی تغییرات معنی‌دار در گروه‌هایی که در معرض غلظت‌های بالاتری از اتانول بودند مشاهده شد (نمودار ۱). بطوریکه میانگین میزان حیات سلولی در گروه‌های اتانول ۱۶۰ mM در مقایسه با گروه کنترل به کمترین میزان خود یعنی حدود ۵۰ درصد گروه کنترل رسید و این کاهش معنی‌دار بود ($p < 0.01$). در مقایسه میزان حیات سلولی بین گروه‌های مواجهه ۲۴ ساعته با ۴۸ ساعته تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

به همین ترتیب، سری دیگری از سلول‌های سرتولی، به مدت ۲۴ یا ۴۸ ساعت در معرض محیط کشت حاوی غلظت‌های ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ سولفات روی قرار گرفتند. بررسی‌های آماری بیانگر الفاء تغییرات در میزان حیات سلولی در این گروه‌ها بود. در هر دو

پاسخ دهی نسبت به روی را داشتند، انتخاب شدند. بر اساس آن گروه‌های اصلی مورد مطالعه به چهار گروه شامل (۱) گروه اتانول ۱۶۰ mM، (۲) گروه روی ۸، ۳) گروه پیش‌درمانی با روی ۸ μ M که بعداً با اتانول ۱۶۰ mM مواجهه شدند و (۴) گروه کنترل تقسیم شدند. در طول انجام آزمایشات محیط کشت در گروه‌های مربوطه هر ۲۴ ساعت با محیط کشت حاوی اتانول و یا روی تعویض می‌گردید و در مورد گروه کنترل از محیط کشت کامل برای تعویض استفاده می‌شد. برای گروه‌های فوق ۵ بار تکرار در نظر گرفته شد، بدین معنی که سلول‌ها در ۵ چاهک از هر پلیت برای هر غلظت/زمان کشت داده شدند. با توجه به اینکه در مواجهه ۴۸ ساعته بیشترین پاسخ دهی دیده شد این زمان برای بررسی‌های بعدی انتخاب گردید.

- بررسی میزان حیات سلولی با روش MTT:

میزان حیات سلولی با استفاده از کیت سنجش تکثیر سلولی (Cayman Chemical Company, USA) MTT ارزیابی شد. در این سنجش، MTT (به دلیل داشتن بار مثبت و پتانسیل غشای پلاسمایی سلول‌ها) توسط سلول‌ها برداشت شده و توسط NADPH اکسیدور دوکتاز داخل سلولی به فورمازان احیا می‌گردد. کریستال‌های فورمازان دارای رنگ بنفش تیره می‌باشند که حل کردن این کریستال‌ها با محلول حل‌کننده کریستال، رنگی در محیط ایجاد می‌کند که در طول موج ۵۷۰ nm قابل اندازه‌گیری است. سنجش MTT طبق مراحل زیر انجام گرفت: (۱) سلول‌ها در پلیت ۹۶ چاهکی با تراکم 5×10^3 cells/well در 100μ l از محیط، کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور حاوی CO₂ قرار گرفتند. (۲) سلول‌ها طبق گروه بندی در مواجهه با اتانول، روی و یا محیط کشت کامل قرار گرفتند. (۳) پس از طی ۲۴ ساعت از آخرین مواجهه، 10μ l از معرف MTT به هر چاهک اضافه شد. (۴) به آرامی و به مدت یک دقیقه روی شیکر ارییتال مخلوط گردید. (۵) سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند که منجر به ایجاد کریستال‌های تیره در ته چاهک شد. (۶) محیط کشت هر چاهک بدون آسیب رساندن به سلول‌های تک لایه، اسپیره شد. (۷) 100μ l از محلول حل‌کننده کریستال به هر چاهک افزوده شد که این محلول رنگ بنفشی در محیط ایجاد کرد. (۸) جذب هر نمونه در طول موج ۶۳۰-۵۴۵ nm با استفاده از میکروپلیت ریدر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

- بررسی مورفولوژیکی سلول‌های TM4:

بررسی مورفولوژیکی کشت سلول‌های سرتولی (TM4) توسط دو مشاهده گر و با استفاده از میکروسکوپ معکوس (invert) با بزرگنمایی ۲۰ و ۴۰ انجام شد. سلول‌ها بطور کلی از نظر شکل، زوائد سیتوپلاسمی و همچنین میزان همپوشانی سلول‌ها در سطح

سیتوپلاسم و زوائد سیتوپلاسمی کمتر، سلول‌های ستاره‌ای یا پلی گونال^۳ (P) با سیتوپلاسم و زوائد سیتوپلاسمی بیشتر. (۲) میزان همپوشانی^۴ سطح پلیت و فضاهای خالی از کشت به صورت درصد. تغییرات شکل سلول‌ها:

مقایسه تغییرات مورفولوژیکی گروه کنترل با گروه اتانول بیانگر توانائی اتانول در القا تغییر در شکل سلول‌های تحت مواجهه بود. در گروه کنترل اکثر سلول‌ها به شکل سلول‌های ستاره‌ای یا پلی گونال با میزان سیتوپلاسم و زوائد سیتوپلاسمی زیاد که زوائد سیتوپلاسمی به شکل استپاله‌های درهم فرورفته^۵ مشخص بودند، دیده شدند (شکل ۱-A). در آنالیز آماری میزان سلول‌های پلی گونال در این گروه $91/8 \pm 1/3$ درصد ارزیابی شد در حالی که در گروه اتانول با میانگین $19/4 \pm 4/4$ درصد حاکی از کاهش محسوس نسبت به گروه کنترل بود ($P < 0.0001$) (شکل ۱-B و ۱-A). از سوی دیگر در گروه کنترل سلول‌های دوکی یا فیبروبلاستی با میزان سیتوپلاسم و زوائد سیتوپلاسمی کم، فقط به میزان $8/75 \pm 1/25$ درصد گزارش شد در حالی که تعداد این سلول‌ها در گروه اتانول زیاد و با میانگین $80/6 \pm 4/4$ درصد برآورد شد (شکل ۱-B و ۱-A). در گروه مواجهه با روی نیز شکل سلول‌ها در اکثر زمینه‌ها مشابه گروه کنترل و به صورت سلول‌های پلی گونال با میانگین $90 \pm 1/6$ درصد بود که به جز گروه کنترل، با سایر گروه‌های مورد مطالعه تغییرات معنی دار بود ($P < 0.001$) (شکل ۱-D). همچنین در گروه اتانول پیش درمانی شده با روی، میانگین سلول‌های پلی گونال نسبت به گروه کنترل کاهش، ولی نسبت به گروه اتانول افزایش یافته بود ($P < 0.001$) و درصد سلول‌های پلی گونال در این گروه $76/9 \pm 2$ درصد گزارش شد (شکل ۱-C). تغییرات میزان همپوشانی سلول‌ها:

براساس بررسی میکروسکوپی و آنالیز آماری، میزان همپوشانی سطح پلیت توسط سلول‌ها در گروه کنترل $96/3 \pm 2$ درصد بود که در گروه اتانول کاهش معنی‌داری با میانگین $25 \pm 1/9$ درصد نشان داد (شکل ۱-B و ۱-A). در گروه روی، میزان همپوشانی سلول‌ها تقریباً مشابه گروه کنترل و با میانگین $94/4 \pm 1/5$ درصد گزارش شد که با سایر گروه‌های مطالعه، به جز گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.001$) (شکل ۱-D). در گروه اتانول پیش درمانی شده با روی، میزان همپوشانی سطح پلیت با میانگین آماری $79/4 \pm 2$ درصد بود که در مقایسه با گروه‌های کنترل و روی کاهش، ولی نسبت به گروه اتانول افزایش یافته بود ($P < 0.001$) (شکل ۱).

زمان مواجهه، میزان حیات سلولی در گروه‌هایی که در معرض غلظت‌های پایین تری از روی قرار داشتند نسبت به گروه کنترل که فقط محیط کشت کامل دریافت نموده بود افزایش معنی‌داری نشان داد (نمودار ۲). بطوریکه به‌عنوان مثال، میزان حیات سلولی از 100 ± 16 درصد در گروه کنترل، به 40.3 ± 4.2 درصد در گروهی که به مدت ۴۸ ساعت روی $8 \mu\text{M}$ دریافت کرده بودند، افزایش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.001$). با افزایش غلظت روی تفاوت در میزان حیات سلولی در مقایسه با گروه کنترل و سایر گروه‌های بررسی شده کاهش یافت. به‌طوریکه در گروه‌های دریافت کننده روی $64 \mu\text{M}$ به میزان 112 ± 13 درصد رسید. همچنین تفاوت چشمگیر و معنی‌داری از نظر آنالیزهای آماری بین مواجهه‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته گزارش نشد.

با توجه به اثرات توکسیک القاء شده توسط اتانول 160 mM و اثرات محافظتی روی $8 \mu\text{M}$ ، آزمایشی با هدف بررسی اثرات توأم اتانول و روی صورت گرفت. بدین منظور، سری سوم سلول‌ها، ابتدا به مدت ۴۸ ساعت با روی $8 \mu\text{M}$ پیش درمانی شدند و سپس مجدداً به مدت ۴۸ ساعت در معرض اتانول 160 mM قرار گرفتند، سپس میزان حیات سلولی در آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نتایج آماری میزان حیات سلولی در این گروه با میانگین $392/5 \pm 136$ درصد نسبت به گروه اتانول که با روی پیش درمانی نشده بود با میانگین $103/5 \pm 31/4$ درصد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$) (نمودار ۳). در آخرین سری آزمایشات بررسی حیات سلولی، اثرات مواجهه با اتانول 160 mM ، روی $8 \mu\text{M}$ و گروهی پیش درمانی (در مواجهه‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته) بر میزان حیات سلولی با گروه کنترل مقایسه شدند. همانطور که در نمودار شماره ۴ آورده شده است، میزان حیات سلولی در گروه اتانول نسبت به کنترل کاهش و در گروه روی نسبت به کنترل افزایش یافت. همچنین گروهی که قبل از مواجهه با اتانول در معرض روی قرار گرفته بودند میزان حیات سلولی بیشتری نسبت به گروه بدون پیش درمانی نشان می‌دهند (نمودار ۴).

- تغییرات مورفولوژیکی در گروه‌های مواجهه با اتانول، روی و پیش درمانی:

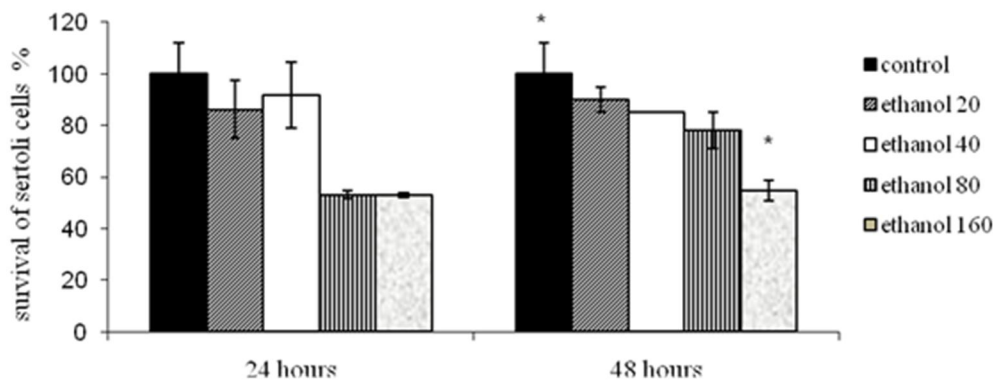
کشت سلول‌های سرتولی بعد از مواجهه ۴۸ ساعته با اتانول (160 mM)، روی ($8 \mu\text{M}$) و اتانول (160 mM) پیش درمانی شده با روی ($8 \mu\text{M}$) مورد بررسی مورفولوژیکی قرار گرفتند و تغییرات ایجاد شده ارزیابی و با یکدیگر و با گروه کنترل مقایسه شدند. شاخصهای مورد بررسی شامل موارد زیر بودند: (۱) شکل سلول‌ها و زوائد سیتوپلاسمی: سلول‌های دوکی شکل یا فیبروبلاستی^۲ (F) با

³ Polygonal

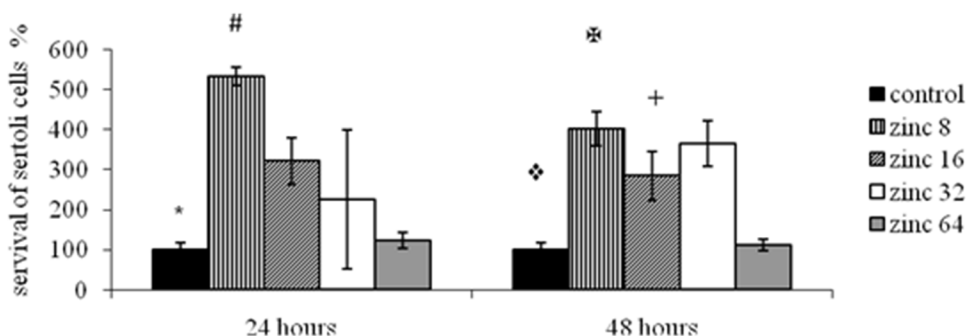
⁴ Confluency

⁵ Interdigitating

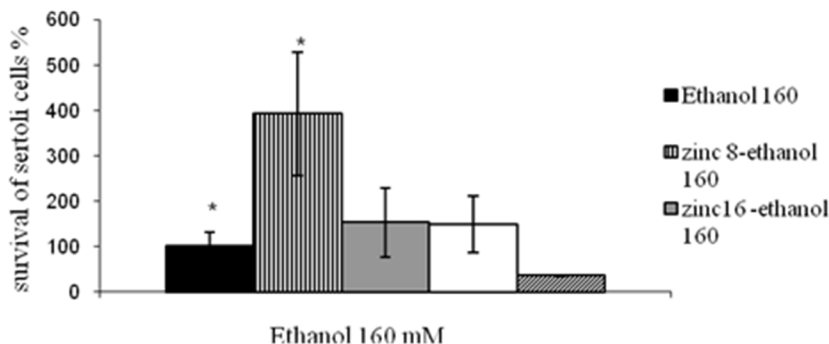
² Fibroblasty



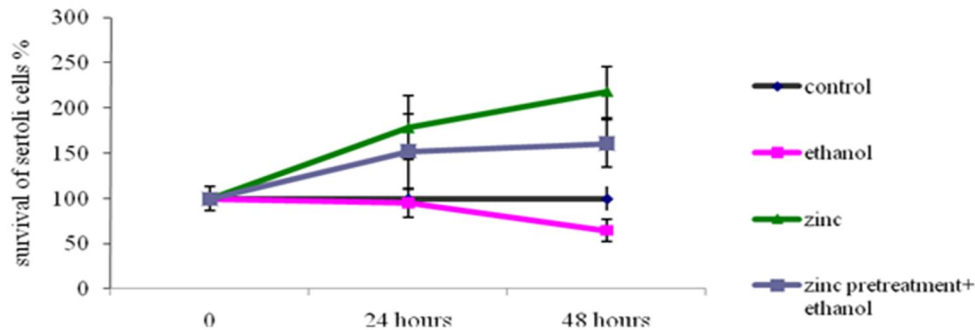
نمودار (1): مقایسه اثرات مواجهه با غلظت های مختلف اتانول بر میزان حیات سلولی در کشت سلول های سرتولی در مواجهه های ۲۴ و ۴۸ ساعته. این نمودار حاکی از کاهش در میزان حیات سلولی با افزایش در غلظت اتانول می باشد ولی تفاوت معنی دار بین گروه اتانول 160mM و گروه کنترل در مواجهه ۴۸ ساعته وجود دارد.
* بیانگر تغییرات معنی دار می باشد (P<0.05).



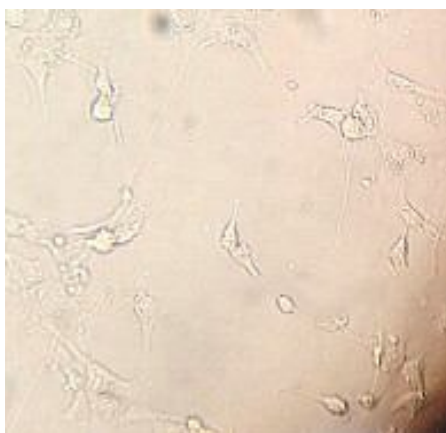
نمودار (2): مقایسه اثرات مواجهه با غلظت های مختلف روی بر میزان حیات سلولی در کشت سلول های سرتولی در مواجهه های ۲۴ و ۴۸ ساعته. علامت های گذاشته شده تفاوت های معنی دار را مطابق با توضیح نشان می دهند:
* بیانگر تغییرات معنی دار بین گروه کنترل و روی ۸ μM در مواجهه ۲۴ ساعته می باشد (P<0.001).
بیانگر تغییرات معنی دار بین گروه روی ۸ μM و روی ۶۴ μM در مواجهه ۲۴ ساعته می باشد (P<0.01).
❖ بیانگر تغییرات معنی دار بین گروه کنترل و گروه های روی ۸، ۱۶ و ۳۲ μM در مواجهه ۴۸ ساعته می باشد (P<0.01).
* بیانگر تغییرات معنی دار بین گروه روی ۸ μM و روی ۶۴ μM در مواجهه ۴۸ ساعته می باشد (P<0.001).
+ بیانگر تغییرات معنی دار بین گروه روی ۱۶ μM و روی ۶۴ μM در مواجهه ۴۸ ساعته می باشد (P<0.05).



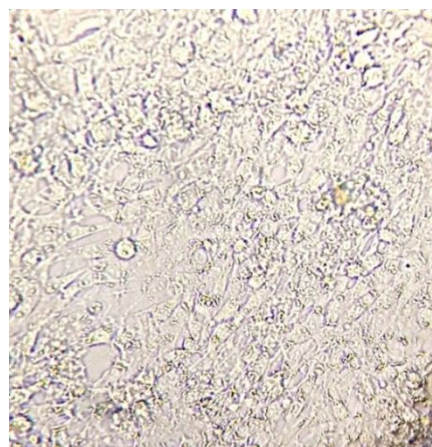
نمودار (3): مقایسه تغییرات در میزان حیات سلولی ناشی از مواجهه با ۱۶۰mM اتانول در گروه هایی که تحت پیش درمانی با غلظت های مختلف روی قرار گرفتند. در این بررسی سلول ها در معرض غلظت های ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ μM، به مدت ۴۸ ساعت قبل از مواجهه با اتانول قرار گرفتند. این مقایسه افزایش حیات سلولی در گروه پیش درمانی با روی ۸μM نسبت به گروه اتانول ۱۶۰mM را نشان می دهد.
* بیانگر تغییرات معنی دار می باشد (P<0.05).



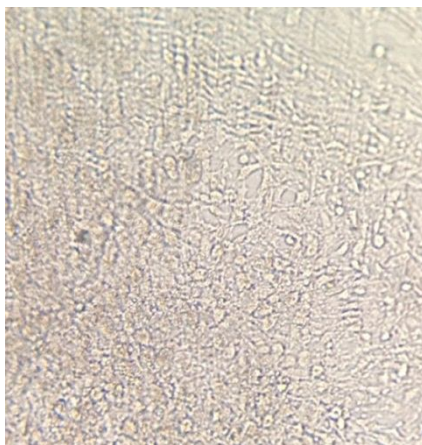
نمودار (4): اثرات ناشی از تیمارهای مختلف بر میزان حیات سلولی در کشت سلول‌های سرتولی. سلول‌های سرتولی به مدت ۲۴ یا ۴۸ ساعت تحت مواجهه با محیط کشت کامل (گروه کنترل)، ۱۶۰mM اتانول (گروه اتانول) و ۸ μM روی (گروه روی) قرار گرفتند. همچنین در گروه پیش درمانی، سلول‌ها ابتدا به مدت ۴۸ ساعت تحت پیش درمانی با ۸μM روی قرار گرفتند و سپس به مدت ۲۴ یا ۴۸ ساعت با ۱۶۰mM اتانول مواجهه یافتند. نتایج به صورت $\text{mean values} \pm \text{S.E.M}$ ارائه شده‌اند و حاصل از دو بار کشت جداگانه می‌باشند.



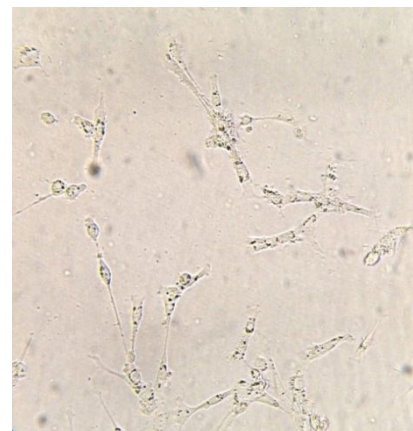
ب



الف



د



ج

شکل (1): بررسی مورفولوژیکی سلول‌های سرتولی در گروه‌های مورد مطالعه با میکروسکوپ معکوس.

الف: گروه کنترل، ب: گروه اتانول (۱۶۰mM)، ج: گروه اتانول پیش درمانی شده با روی، د: گروه روی (۸μM). سلول‌ها با محیط کشت حاوی اتانول، روی و یا محیط کشت کامل (برای گروه کنترل) مواجهه شدند. بعد از ۴۸ ساعت مواجهه، تغییرات مورفولوژیکی با میکروسکوپ معکوس (درشت نمایی ۴۰) مورد مطالعه قرار گرفت. مطابق با شکل، در گروه کنترل و روی، غالبیت سلول‌ها به شکل سلول‌های استتاله دار پلی گونال و با میزان همپوشانی بالا هستند. در گروه اتانول، بیشتر سلول‌ها به شکل دوکی با استتاله‌ها و میزان همپوشانی کمتر دیده می‌شوند. در گروه اتانول پیش درمانی شده با روی، میزان سلول‌های پلی گونال و میزان همپوشانی از گروه کنترل و روی کمتر ولی از گروه اتانول بیشتر می‌باشد.

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات ناشی از مواجهه تنها و توأم اتانول و روی بر کشت سلول‌های سرتولی موشی از نقطه نظر بررسی تغییرات مورفولوژیکی و میزان حیات سلولی انجام گرفت. در این مطالعه سلول‌های سرتولی در معرض غلظت‌های مختلف اتانول و روی و یا مواجهه توأم آن‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. مهم‌ترین یافته ما حاکی از کاهش وابسته به غلظت ولی غیر وابسته به زمان در میزان حیات سلولی و تغییر در مورفولوژی سلول در گروه‌های مواجهه با اتانول بود. همچنین افزایش در میزان حیات سلولی در گروه‌های مواجهه یافته با روی و یا گروه‌هایی که قبل از اتانول در معرض روی قرار گرفته بودند دیده شد.

علی‌رغم وجود مطالعات متعددی در خصوص الفاء تغییرات فراساختاری، پاتولوژیکی و بیوشیمیایی ناشی از اتانول، از جمله تغییرات آپوپتوتیک در بافت‌های مختلف بدن (۲۰-۲۱)، تناقضات در مورد اثر اتانول در قدرت باروری چالش برانگیز است (۱۴-۱۵). با توجه به تضاد و خلاء موجود و محدود بودن مطالعات *in vitro* که در پی کشف مکانیسم‌های درگیر در تغییرات تولیدمثلی ایجاد شده توسط اتانول هستند و از سوی دیگر تمرکز بیشتر مطالعات روی سلول‌های زایا و اسپرم، در این تحقیق سلول‌های سرتولی هدف مطالعه قرار گرفتند.

در مطالعه حاضر در ابتدا کشت سلول‌های سرتولی در معرض غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ mM از اتانول در مواجهه‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته قرار گرفتند. میزان حیات سلولی در هر دو زمان مواجهه با افزایش غلظت اتانول کاهش یافت و نهایتاً در غلظت ۱۶۰ mM به حدود ۵۰ درصد حیات سلولی گروه کنترل رسید. در مطالعات قبلی، ایجاد تغییرات آپوپتوتیکی ناشی از اتانول در سلول‌های زایا و اسپرم (۱۷-۱۸)، سلول‌های لیدیک (۲۴) و همچنین سرتولی (۱۷)، در غلظت‌های مشابهی با مطالعه حاضر توسط محققین دیگر گزارش شده است. با اینکه در این مطالعات، بررسی میزان حیات سلولی مستقیماً مورد سنجش قرار نگرفته است و تمرکز اصلی بیشتر روی تغییرات الفاء شده توسط اتانول روی میزان بیان ژن‌ها و پروتئین‌های مطرح در جریان آپوپتوز سلولی بوده است ولی در مجموع، از نقطه نظر الفاء تغییرات در میزان زیست پذیری و مهار تکثیر سلولی ناشی از اتانول در غلظت‌های مشابه، این گزارشات همسو و موافق با یافته‌های ما می‌باشند. در مورد تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های سرتولی، از آنجائیکه بررسی‌های انجام شده در مطالعه حاضر به شکل کلی و با کمک میکروسکوپ معکوس بوده است، قضاوت در مورد جزئیات بیشتر و خصوصاً تغییرات مربوط به هسته امکان پذیر نبود. ولی به‌طور کلی، الفاء اثرات اتانول به شکل بیشتر شدن جاهای خالی در پلیت و کاهش

در میزان همپوشانی سطح پلیت می‌تواند ناشی از کاهش در تعداد سلول‌های زنده و قدرت چسبندگی آن‌ها و افزایش میزان کندن شدن آن‌ها باشد. همچنین کاهش در میزان و تعداد زوائد سیتوپلاسمی احتمالاً منعکس کننده تغییرات در زیست پذیری و حیات سلولی ناشی از اتانول می‌باشد. در تأیید یافته‌های ما، کاهش در سائز سلولی و میزان سیتوپلاسم در سلول‌های لایدیک ایزوله شده از بیضه حیوانات تحت تغذیه با اتانول (۲۵) و حباب دار و نامنظم شدن سلول و افزایش در میزان جدا شدگی و کندگی از پلیت در کشت سلول‌های لیدیک مواجهه شده با اتانول (۲۲، ۲۴) گزارش شده است. متفاوت بودن نوع سلول مورد بررسی و روش کار، توجیه کننده بعضی تفاوت‌ها بین مطالعه حاضر با این گزارشات می‌باشد که لزوم انجام مطالعات دقیق تر با کمک میکروسکوپ فلورسانس و یا الکترونی را مطرح می‌سازد.

براساس مطالعات پیشین، روی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت، ماده ای ضروری برای حیات سلول‌های زایا و بیضه ای، فرایند اسپرماتوزن، حرکت اسپرم و نهایتاً باروری می‌باشد (۲۲، ۲۶-۲۸). از سوی دیگر به نظر می‌رسد یک حالت عدم تعادل بین اکسیدانت ها و آنتی اکسیدانت ها در افراد مصرف کننده اتانول وجود دارد (۲۲). در مطالعه حاضر، در یکی از گروه‌های مورد مطالعه، سلول‌ها ابتدا با روی ۸ μM پیش درمانی شده و سپس در معرض اتانول ۱۶۰ mM قرار گرفتند. پیش درمانی با روی به میزان قابل توجهی باعث افزایش میزان حیات سلولی در این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های در معرض اتانول تنها شد و در واقع اثرات اتانول در کاهش میزان حیات سلولی را جبران نمود (نمودار ۳). همسو با این یافته، تحقیقات بر روی سلول‌های کبدی نشان داده‌اند که روی از ایجاد آپوپتوز ناشی از اتانول در هپاتوسیت‌های کبدی از طریق مهار استرس اکسیداتیو و مسیرهای درگیر در آپوپتوز ممانعت می‌کند (۲۲، ۲۳). هرچند در مطالعه حاضر اثرات آپوپتوتیکی اتانول و ضد آپوپتوزی روی به‌طور مستقیم مورد ارزیابی قرار نگرفته و از این لحاظ با مطالعه فوق متفاوت است، ولی حداقل از این نقطه نظر که روی از اثرات سمی و ضد حیات سلولی اتانول در سلول‌های سرتولی مقابله می‌کند و یا آنرا کاهش می‌دهد همسو و موافق با مطالعه فوق می‌باشد. از سوی دیگر طبق یافته‌های ما، پیش درمانی با روی نه تنها اثرات اتانول در کاهش میزان حیات سلولی را جبران کرد بلکه میزان زیست پذیری در این سلول‌ها را حتی نسبت به گروه کنترل افزایش داد (نمودار ۴). در همین راستا، در گروه دیگری از سلول‌ها که به تنهایی در معرض غلظت‌های مختلفی از روی خصوصاً در زیر گروه‌های ۸ و ۱۶ μM قرار گرفتند، در هر دو مواجهه ۲۴ و ۴۸ ساعته، میزان حیات سلولی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت (نمودار ۲ و ۴).

مطالعات مقایسه ای دقیق نشان داده که سلول‌های سرتولی موشی به ویژه از نظر ظرفیت تکثیر و تمایز سلولی و خصوصیات ژنومی مشابه انسان است (۳۰،۲۹). اگر این چنین باشد، با شاهد گرفتن نتایج تحقیق حاضر و تحقیقات مشابه احتمال دارد کاهش حیات و زیست‌پذیری ناشی از اتانول در سلول‌های سرتولی، حداقل بخشی از مکانیسم‌های احتمالی مطرح در ناباروری مردان الکلی باشد. بدیهی است از یک سو تعمیم اثرات دیده شده در این مطالعه به سلول‌های انسانی و از سوی دیگر کشف جزئیات سیگنال‌ها و مسیرهای سلولی - مولکولی مسئول در این پروسه که بتواند ارتباط اثرات سوء اتانول و اثرات محافظتی روی را شفاف نماید و یا آنرا به‌عنوان یک مکمل مؤثر در پیشگیری از ناباروری در مردان الکلی معرفی نماید، بررسی بیشتری را در این زمینه می‌طلبد و تحقیق حاضر می‌تواند رهگشا و پایه ای برای مطالعات آینده باشد.

نتیجه استنباط شده از این دو یافته دلالت بر این واقعیت دارد که روی علاوه بر کاهش اثرات اتانول می‌تواند از مرگ خود به خودی (و یا مرگ برنامه ریزی شده) سلول‌های سرتولی که با گذشت زمان اتفاق می‌افتد نیز جلوگیری کند. در تأیید این یافته‌ها، بررسی‌های مورفولوژیکی مطالعه حاضر حاکی از آن بوده است که پیش‌درمانی با روی باعث جبران اثرات اتانول در تغییرات شکل، میزان همپوشانی و کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها بوده است. هر چند در سلول‌هایی که در معرض روی به تنهایی قرار گرفته بودند نسبت به گروه کنترل از نظر مورفولوژیکی تفاوت واضح و معنی‌داری وجود نداشت ولی احتمالاً بروز زودتر تغییرات بیوشیمیایی نسبت به تغییرات مورفولوژیکی (۱۷) توجیه‌کننده این یافته باشد که ضرورت انجام بررسی‌های مورفولوژیکی با مواجهه‌های طولانی‌تر را مطرح نماید.

References:

1. RM K. Management of the infertile couple. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;6:8-21.
2. Bhasin S, de Kretser DM, Baker HW. Clinical review 64: Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79(6):1525-9.
3. Dadhich P, Ramasamy R, Lipshultz LI. The male infertility office visit. *Minerva Urol Nefrol* 2015;
4. Anderson K, Nisenblat V, Norman R. Lifestyle factors in people seeking infertility treatment - A review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2010;50(1):8-20.
5. Alvarez S. Do some addictions interfere with fertility? *Fertil Steril* 2015;103(1):22-6.
6. Kumar S, Kumari A, Murarka S. Lifestyle factors in deteriorating male reproductive health. *Indian J Exp Biol* 2009;47(8):615-24.
7. Pasqualotto FF, Lucon AM, Sobreiro BP, Pasqualotto EB, Arap S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 2004;59(6):375-82.
8. Guilbert JJ. The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life. *Educ Health (Abingdon)* 2003;16(2):230.
9. Goldney RD. Some facts about alcohol consumption. *Aust N Z J Psychiatry* 2013;47(2):193.
10. Van Thiel DH, Gavaler JS, Cobb CF, Sherins RJ, Lester R. Alcohol-induced testicular atrophy in the adult male rat. *Endocrinology* 1979;105(4):888-95.
11. Peugh J, Belenko S. Alcohol, drugs and sexual function: a review. *J Psychoactive Drugs* 2001;33(3):223-32.
12. Dadhich P, Ramasamy R, Lipshultz LI. The male infertility office visit. *Minerva Urol Nefrol* 2015.
13. Carter RC, Jacobson JL, Dodge NC, Granger DA, Jacobson SW. Effects of prenatal alcohol exposure on testosterone and pubertal development. *Alcohol Clin Exp Res* 2014;38(6):1671-9.
14. Sadeu JC, Hughes CL, Agarwal S, Foster WG. Alcohol, drugs, caffeine, tobacco, and environmental contaminant exposure: Reproductive health consequences and clinical implications. *Crit Rev Toxicol* 2010; 40(7):633-52.
15. La Vignera S, Condorelli RA, Balercia G, Vicari E, Calogero AE. Does alcohol have any effect on

- male reproductive function? A review of literature. *Asian J Androl* 2013;15(2):221-5.
16. Farghali H, Williams DS, Gavalier J, Van Thiel DH. Effect of short-term ethanol feeding on rat testes as assessed by ³¹P NMR spectroscopy, ¹H NMR imaging, and biochemical methods. *Alcohol Clin Exp Res* 1991;15(6):1018-23.
 17. Zhu Q, Van Thiel DH, Gavalier JS. Effects of ethanol on rat Sertoli cell function: studies in vitro and in vivo. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21(8):1409-17.
 18. Eid NA, Shibata MA, Ito Y, Kusakabe K, Hammad H, Otsuki Y. Involvement of Fas system and active caspases in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol-treated rats. *Int J Androl* 2002;25(3):159-67.
 19. Shirpoor A, Norouzi L, Khadem-Ansari MH, Ilkhanizadeh B, Karimipour M. The Protective Effect of Vitamin E on Morphological and Biochemical Alteration Induced by Pre and Postnatal Ethanol Administration in the Testis of Male Rat Offspring: A Three Months Follow-up Study. *J Reprod Infertil* 2014;15(3):134-41.
 20. Oklota M, Niemcunowicz-Janica A, Zaluski J, Ptaszynska-Sarosiek I. Contribution of ethanol in apoptosis induction. *Arch Med Sadowej Kryminol* 2009;59(3):238-42.
 21. Higuchi H, Kurose I, Kato S, Miura S, Ishii H. Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20(9 Suppl):340A-6A.
 22. Szuster-Ciesielska A, Plewka K, Daniluk J, Kandefers-Szerszen M. Zinc inhibits ethanol-induced HepG2 cell apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;229(1):1-9.
 23. Zhou Z, Liu J, Song Z, McClain CJ, Kang YJ. Zinc supplementation inhibits hepatic apoptosis in mice subjected to a long-term ethanol exposure. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233(5):540-8.
 24. Jang MH, Shin MC, Shin HS, Kim KH, Park HJ, Kim EH, et al. Alcohol induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells via bax-dependent caspase-3 activation. *Eur J Pharmacol* 2002;449(1-2):39-45.
 25. Gavalier JS, Perez HA, Estes L, Van Thiel DH. Morphologic alterations of rat Leydig cells induced by ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;18 Suppl 1:341-7.
 26. Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol* 2012;86(4):521-34.
 27. Croxford TP, McCormick NH, Kelleher SL. Moderate zinc deficiency reduces testicular Zip6 and Zip10 abundance and impairs spermatogenesis in mice. *J Nutr* 2011;141(3):359-65.
 28. Kumari D, Nair N, Bedwal RS. Protein carbonyl, 3beta, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in testes and serum FSH, LH, and testosterone levels in zinc deficient Wistar rats. *BioFactors* 2012;38(3):234-9.
 29. Beumer TL, Kiyokawa H, Roepers-Gajadien HL, van den Bos LA, Lock TM, Gademan IS, et al. Regulatory role of p27kip1 in the mouse and human testis. *Endocrinology* 1999;140(4):1834-40.
 30. Ahmed EA, Barten-van Rijbroek AD, Kal HB, Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Pelt AM, et al. Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. *Biology of reproduction* 2009;80(6):1084-91.

THE PROTECTIVE EFFECTS OF ZINC ON ETHANOL-INDUCED TOXICITY ON VIABILITY OF MOUSE SERTOLI CELLS *IN VITRO*

Nazila Pourhasanali¹, Maryam Poorheydar², Fatemeh Kheradmand³, Morteza Motazakker⁴, Shiva Roshan-Milani^{5*}

Received: 10 Oct, 2014; Accepted: 4 Jan, 2015

Abstract

Background & Aims: Ethanol has overall toxic effects on male fertility which directly or indirectly disturbs spermatogenesis. Zinc as an antioxidant agent, reduces ethanol-induced toxic effects on somatic (non-sexual) cells. However, the underlying mechanism of effects of ethanol and zinc on fertility potential especially on testis somatic cells is poorly understood. Accordingly, in the present study was aimed to investigate the effects of single and co-administration of ethanol and zinc on viability and morphology of cultured sertoli cells.

Materials & Methods: The mouse sertoli cells were cultured and investigated in four main groups including: ethanol (160mM), zinc (8μM), pretreatment and control, in which cells were exposed to treatment containing medium for 24 or 48 hours. In pretreatment group, cells were incubated with zinc before ethanol exposure and in control group cells were only incubated with free medium without any further treatment. The cellular viability was then assessed using MTT method and morphological alterations were investigated with invert microscope.

Results: There was a significant decrease in cell viability and some morphological alterations in ethanol group compared to other groups. Cell viability increased in zinc group compared to other groups even in the control group. In pretreatment group cell viability significantly decreased in comparison to zinc group but increased compared to ethanol group.

Conclusion: Zinc reduces ethanol-induced effects in decreasing cell viability. Zinc may prevent spontaneously- or pathologically-induced apoptosis in germ cells suggesting a probable clinical importance and therapeutic effects of zinc on alcoholism and male infertility.

Keywords: Cell viability, Sertoli cell, Infertility, Ethanol, Zinc

Address: Cellular and Molecular Research Center, Physiology Department, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran, Tel: +989144477954

Email: shivamilani@umsu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2015; 25(12): 1091 ISSN: 1027-3727

¹ Master Student, Department of Physiology, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

² MSC in Histology, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

³ Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Virology, Faculty of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Neurophysiolog Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)