

اثر DAPT بر سطح سرمی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و گیرنده‌ی محلول آن در موش‌های چاق

هاجر سعیدی^۱، نیلوفر شعبانی‌کیا^۱، المیرا کلانتری^۱، زویا طاهر گورابی^۲، دکتر مجید خزاعی^۳

چکیده

مقدمه: امروزه چاقی به عنوان یکی از عوامل خطر ساز برای بسیاری از بدخیمی‌ها در نظر گرفته می‌شود. پدیده‌ی آنژیوژنز به طور بارز در موارد فیزیولوژیکی همچون ترمیم زخم‌ها و شرایط پاتولوژیکی همچون رشد تومورها نقش زیادی دارد. یکی از آنزیم‌هایی که در این پدیده در پاسخ به فاکتورهای آنژیوژنیک نقش دارد، آنزیم گاما سکرناز است. هدف این مطالعه، بررسی اثر DAPT بر سطح سرمی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor یا VEGF) و گیرنده‌ی محلول آن (Vascular endothelial growth factor receptor 1 یا VEGFR1) در موش‌های Balb/C چاق بود.

روش‌ها: تعداد ۱۲ موش از نژاد Balb/C از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. جهت ایجاد چاقی، حیوانات به مدت ۲۰ هفته تحت رژیم غذایی با محتوای گروه چربی بالا قرار گرفتند. پس از این مدت، حیوانات به دو گروه دریافت‌کننده‌ی داروی DAPT (یک مهارکننده‌ی گاما سکرناز) و شاهد تقسیم شدند. DAPT به مدت ۱۴ روز به صورت زیر جلدی با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شد. به گروه شاهد حلال DAPT تزریق شد. در پایان آزمایش حیوانات با کتامین بیهوش شدند و نمونه‌ی خونی برای تعیین سطح سرمی VEGF و VEGFR1، از آن‌ها گرفته شد.

یافته‌ها: تجویز DAPT به موش‌ها به مدت ۱۴ روز تغییر معنی‌داری در وزن حیوانات ایجاد نکرد. سطح سرمی VEGF در گروه دریافت‌کننده‌ی DAPT تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت ($P > 0.05$)، در حالی که سطح سرمی VEGFR1 در حیواناتی که DAPT دریافت کرده بودند، به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر DAPT بر سطح سرمی VEGFR1 به نظر می‌رسد این دارو ممکن است در فرایند آنژیوژنز و از جمله مهار رشد تومورها مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: چاقی، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، رژیم پر چرب

مقدمه

حدی در حال افزایش است که تهدید آن برای بشریت را می‌توان با تهدید تغییرات آب و هوا مقایسه کرد. امروزه چاقی به عنوان یکی از عوامل خطر ساز برای بسیاری از بدخیمی‌ها در نظر گرفته می‌شود. بر اساس بررسی‌های انجام‌شده توسط محققان دانشکده‌ی اپیدمیولوژی و بهداشت عمومی کالج سلطنتی لندن اپیدمی چاقی در کشورهای صنعتی به عنوان مهم‌ترین

بر اساس گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت سرطان به عنوان عامل اصلی مرگ بر بیماری‌های قلبی چیره خواهد شد. مرگ ناشی از سرطان حدود ۱۳ درصد از کل مرگ‌ها را در سال ۲۰۰۴ به خود اختصاص داد و تخمین زده می‌شود که این تعداد در سال ۲۰۳۰ به ۱۲ میلیون مرگ افزایش یابد. موارد ابتلا به سرطان به

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

^۱ دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

^۳ دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: khazaei@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مجید خزاعی

عامل ابتلا به برخی انواع سرطان از جمله سرطان کولون، پانکراس، کبد، پروستات و پستان شناسایی شده است (۱-۳). متأسفانه مکانیسم دقیقی که منجر به افزایش احتمال ابتلا به سرطان در افراد چاق می‌شود مشخص نشده است (۴). علاوه بر این، پاسخ بدن افراد چاق به همه‌ی تومورها یکسان نیست (۵).

آنژیوزنز (رگ‌زایی) فرایند تشکیل عروق جدید یا جوانه زدن رگ‌های جدید از رگ‌های موجود در بافت می‌باشد. این فرایند به طور بارز در دوران جنینی و در مواردی در دوران پس از تولد و حتی در بالغین مشاهده می‌شود. موارد فیزیولوژیکی همچون ترمیم زخم‌ها، سیکل‌های قاعدگی و موارد پاتولوژیکی همچون رتینوپاتی دیابتی، آندومتریوز و رشد عروق در انواع تومورها از مثال‌های بارز آنژیوزنز پس از تولد می‌باشند. عوامل متعددی در ایجاد عروق جدید دخیل می‌باشند که از بین آن‌ها می‌توان به نیتریک اکساید (NO) و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) یا آن (Vascular endothelial growth factor receptor) و گیرنده‌های آن (VEGFR1 & 2 یا 1 and 2) اشاره نمود (۱-۳).

یکی از آنزیم‌هایی که در پدیده‌ی رگ‌زایی در پاسخ به عوامل آنژیوزنیک نقش دارد، آنزیم گاما سکرناز است (۵). این آنزیم از طریق مسیر پیام‌دهی Notch عمل می‌کند. مسیر پیام‌دهی Notch یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های انتقال پیام است. این مسیر در تنظیم بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی چون رشد و نمو جنین فعال و دارای نقشی اساسی است (۶). از آن جایی که تومورها نیز برای ادامه‌ی رشد و متاستاز نیاز به آنژیوزنز و رگ‌زایی بیشتر برای تأمین نیازهای متابولیک خود هستند، می‌توان پیش‌بینی کرد که رشد

تومورها با سطح سرمی VEGF رابطه‌ی مستقیم دارد؛ چرا که سطح بالای عوامل آنژیوزنیک از طریق مکانیسم‌های گوناگون، رگ‌زایی درون تومور را تسهیل می‌کند. مطالعات جدید نیز بر فعال شدن نابجای این مسیر در پاتوزنز بسیاری از بدخیمی‌ها دلالت دارد (۷-۸). گاما سکرناز پروتئاز مهمی برای فعال کردن گیرنده‌ی Notch می‌باشد و مهارکننده‌های آنزیم گاما سکرناز از ایجاد Domain داخل سلولی مولکول Notch و در نتیجه فعال شدن آن جلوگیری می‌کنند (۹-۱۴). داروی DAPT یک مهارکننده‌ی آنزیم گاما سکرناز است که موجب مهار پیام‌دهی Notch می‌شود. در مطالعه‌ی پیش رو بر آن بودیم تا تأثیر بلوک کردن گاما سکرناز را از طریق داروی DAPT بر سطح سرمی VEGF و گیرنده‌ی محلول آن (VEGFR1) در موش‌های Balb/C چاق بررسی نماییم.

روش‌ها

در این مطالعه از ۱۲ موش Balb/C ۶ هفته‌ای با وزن حدود ۱۵ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند، استفاده شد. این حیوانات جهت تطابق با محیط لانه‌ی حیوانات یک هفته قبل از شروع مطالعه در حیوان‌خانه‌ی گروه فیزیولوژی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان نگهداری شدند. موش‌ها در طول مطالعه نیز در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور نگهداری شدند. پس از آن حیوانات جهت ایجاد چاقی به مدت ۲۰ هفته تحت رژیم غذایی با محتوای چربی بالا قرار گرفتند که شامل ۶۰ درصد چربی، ۲۰ درصد پروتئین و ۲۰ درصد کربوهیدرات بود (۱۵). پس از این مدت، حیوانات به دو گروه دریافت‌کننده‌ی DAPT و شاهد تقسیم شدند. داروی DAPT نوعی مهارکننده‌ی گاما

وسيله‌ی تکنیک Quantitative sandwich enzyme immunoassay و کیت شرکت R & D Systems (Minneapolis, USA) انجام شد. این کیت حاوی یک نوع آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی برای VEGFR1 موش است. میکروپلیت‌ها با آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی پوشیده شدند. نمونه‌ها، استانداردها و شاهد‌ها به داخل چاهک‌ها افزوده شدند و هر Mouse VEGFR1 موجود با آنتی‌بادی غیر متحرک باند شد. بعد از شستشو جهت حذف مواد باند نشده، یک آنزیم متصل‌شونده به آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی برای VEGFR1 به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از شستشو و حذف آنتی‌بادی‌های باند نشده سوسترای محلول به چاهک‌ها افزوده شد. محصول واکنش آنزیمی یک محصول آبی رنگ بود که پس از افزودن محلول Stop (محلول اسیدی) زرد رنگ شد. شدت رنگ اندازه‌گیری شده با میزان باند شده در مرحله‌ی شروع متناسب بود. در پایان نتایج با منحنی استاندارد خوانده شد.

یافته‌ها

وزن حیوانات با توجه به تغذیه‌ی پر چرب آن‌ها به سرعت رو به افزایش بود. تجویز DAPT به موش‌ها به مدت ۱۴ روز تغییر معنی‌داری در وزن حیوانات ایجاد نکرد ($P > 0/05$). شکل ۱ وزن پایان مطالعه را در دو گروه نشان داده است.

بررسی سطح سرمی VEGF در گروه‌های آزمایش نشان داد که سطح سرمی آن در گروه دریافت‌کننده‌ی DAPT بالاتر از گروه شاهد بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود ($P > 0/05$) (شکل ۲ الف)؛ اما سطح سرمی VEGFR1 در حیواناتی که DAPT دریافت نمودند کمتر از از گروه شاهد بود (شکل ۲ ب).

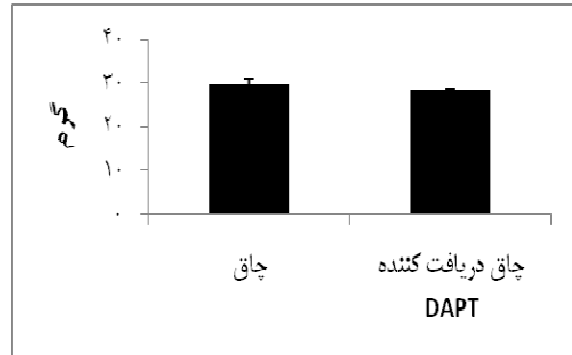
سکرتاز است که در مطالعات قبلی از آن برای مهار آنژیوژنز استفاده شده بود (۱۶، ۱۲). حیوانات دریافت‌کننده‌ی دارو به مدت ۱۴ روز به صورت زیر جلدی تحت درمان با DAPT با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قرار گرفتند (۱۷-۱۸). به گروه دیگر حلال DAPT (محلول DMSO) با همان حجم تزریق شد. در پایان آزمایش حیوانات با کتامین بیهوش شدند و نمونه‌ی خونی از آن‌ها گرفته شد و پس از سانتریفوژ، سرم آن‌ها جهت اندازه‌گیری VEGF و VEGFR1 نگهداری شد. کمیته‌ی اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان فرایند اجرایی این مطالعه را تأیید کرد.

غلظت سرمی VEGF به روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) و با استفاده از کیت R & D Systems (Minneapolis, USA) و با استفاده از استاندارد و مواد موجود در کیت اندازه‌گیری شد. برای این کار حدود ۵۰ میکرولیتر استاندارد یا سرم به چاهک (Wells) میکروپلیت اضافه شد. چاهک‌ها از قبل با آنتی‌بادی مونوکلونال VEGF پوشیده شده بودند و برای ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شده بودند. پس از آن مواد باند نشده شسته شدند. آنتی‌بادی پلی‌کلونال لینک‌شده با آنزیم بر علیه VEGF به چاهک‌ها افزوده شد و برای ۲ ساعت انکوبه شدند. پس از شستشو مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوسترای به چاهک‌ها افزوده و برای ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول Stop برای ایجاد رنگ افزوده شد. دانسیته‌ی اپتیکال در طول موج ۴۵۰ نانومتر و با استفاده از Microplate reader تعیین گردید (۱۹).

اندازه‌گیری و تعیین سطح سرمی VEGFR1 نیز به

ثابت شده است که کودکانی که به طور ژنتیکی دارای سطح سرمی افزایش یافته‌ی VEGF هستند استعداد بالاتری برای ابتلا به چاقی در دوران کودکی و نیز بزرگسالی دارند (۲۱). همچنین اثبات شده است که سطح سرمی این عامل آنژیوژنیک با افزایش شاخص توده‌ی بدنی و نیز بیماری‌های مرتبط با آن چون دیس‌لیپیدمی و آترواسکلروز رابطه‌ی مستقیم دارد (۲۲). حتی در برخی مقالات از VEGF به عنوان دلیل افزایش خطر سرطان سینه در زنان چاق یاد می‌شود (۲۳).

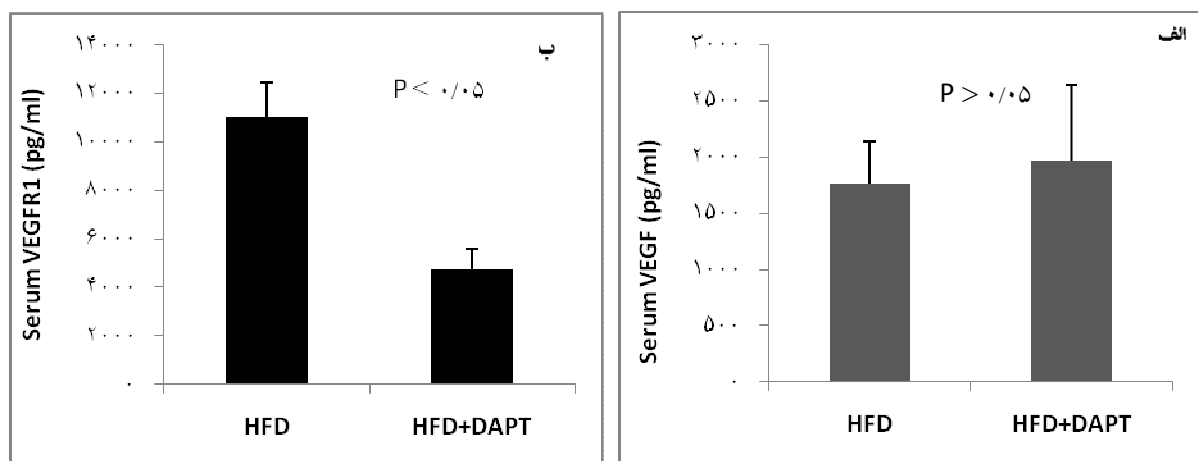
آنزیم گاما سکریتاز یکی از آنزیم‌هایی است که در پدیده‌ی رگ‌زایی نقش دارد. DAPT یکی از داروهایی است که سبب مهار آنزیم گاما سکریتاز می‌گردد. نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز DAPT در موش‌های چاق بدون اثر بر VEGF سبب کاهش سطح سرمی VEGFR1 گردید. گاما سکریتاز یک پروتئاز مهم برای فعال کردن گیرنده‌ی Notch می‌باشد و داروی DAPT که یک مهارکننده‌ی آنزیم گاما سکریتاز است از ایجاد Domain داخل سلولی مولکول Notch و در نتیجه فعال شدن آن جلوگیری می‌کند (۹-۱۴).



شکل ۱. وزن بدن در گروه‌های مختلف در پایان آزمایش

بحث

هدف این مطالعه، بررسی اثر DAPT بر سطح سرمی VEGF و گیرنده‌ی محلول آن (VEGFR1) در موش‌های Balb/C چاق بود. نتایج نشان داد که DAPT سبب کاهش سطح سرمی VEGFR1 گردید، در حالی که سطح سرمی VEGF تغییری نکرد. توسعه‌ی بافت چربی وابسته به آنژیوژنز و نئوواسکولاریزاسیون است. VEGF عامل اصلی و کلیدی برای وقوع آنژیوژنز در بافت چربی است. مطالعات نشان داده‌اند که سطح VEGF در افراد چاق بالاتر از افراد سالم است (۲۰)؛ به گونه‌ای که امروزه



شکل ۲. تغییرات سطح سرمی VEGF و VEGFR1 در دو گروه حیوانات مورد مطالعه

HFD: شاهد تنها با رژیم غذایی پر چرب (High fat diet)

HFD + DAPT: چاق با رژیم غذایی پر چرب همراه با DAPT

چون VEGF وابسته هستند که در افراد چاق سطح خونی آن افزایش می‌یابد.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان استنباط کرد که از آن جا که VEGFR1 اثرات مهمی بر فرایند آنژیوژنز دارد، داروی DAPT حتی در شرایطی که سطح VEGF در حد فیزیولوژیک است نیز می‌تواند بر فرایند آنژیوژنز مؤثر باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثر DAPT بر سطح سرمی VEGFR1 به نظر می‌رسد این دارو ممکن است در فرایند آنژیوژنز و از جمله مهار رشد تومورها مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت تحقیقات و فناوری به خصوص کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی بابت تأمین هزینه‌های این طرح قدردانی می‌گردد.

نتایج یک مطالعه نشان داد که سطح VEGF در موش‌هایی که تحت درمان با داروی DAPT قرار داشتند، نسبت به گروه عدم دریافت دارو بالاتر بود. این مطالعه پیشنهاد کرد که درمان با DAPT از طریق مسیر VEGF اثر می‌گذارد (۲۰). نتایج مطالعه‌ی حاضر عدم تغییر سطح VEGF و کاهش سطح VEGFR1 در گروه دریافت‌کننده‌ی دارو نسبت به گروه شاهد را نشان داد. ممکن است تفاوت مشاهده شده در مطالعه‌ی حاضر و مطالعه‌ی فوق در مدل به کار رفته، باشد. در مطالعه‌ی حاضر موش‌های مورد استفاده حیوانات چاق بودند که سطح VEGF به طور اولیه در آن‌ها بالاتر است.

خطر ابتلا به انواع سرطان‌ها در افراد چاق بیشتر از دیگر افراد جامعه است (۲۴)؛ چرا که همانند سایر بافت‌های بدن تومورهای بدخیم نیز برای رشد و متاستاز به تغذیه از راه عروق نیاز دارند و برای افزایش دانسیته‌ی عروقی به فاکتورهای آنژیوژنیک

References

1. Satchell SC, Mathieson PW. Angiopoietins: microvascular modulators with potential roles in glomerular pathophysiology. *J Nephrol* 2003; 16(2): 168-78.
2. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002; 200(6): 581-97.
3. Chigurupati S, Arumugam TV, Son TG, Lathia JD, Jameel S, Mughal MR, et al. Involvement of notch signaling in wound healing. *PLoS One* 2007; 2(11): e1167.
4. Takeshita K, Satoh M, Ii M, Silver M, Limbourg FP, Mukai Y, et al. Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circ Res* 2007; 100(1): 70-8.
5. Hayashi H, Nakagami H, Takami Y, Sato N, Saito Y, Nishikawa T, et al. Involvement of gamma-secretase in postnatal angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363(3): 584-90.
6. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284(5415): 770-6.
7. Bolos V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL. Notch signaling in development and cancer. *Endocr Rev* 2007; 28(3): 339-63.
8. Hansson EM, Lendahl U, Chapman G. Notch signaling in development and disease. *Semin Cancer Biol* 2004; 14(5): 320-8.
9. Wang M, Wu L, Wang L, Xin X. Down-regulation of Notch1 by gamma-secretase inhibition contributes to cell growth inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells A2780. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393(1): 144-9.
10. Al Haj ZA, Madeddu P. Notch signalling in ischaemia-induced angiogenesis. *Biochem Soc Trans* 2009; 37(Pt 6): 1221-7.
11. Cao L, Arany PR, Wang YS, Mooney DJ. Promoting angiogenesis via manipulation of VEGF responsiveness with notch signaling. *Biomaterials* 2009; 30(25): 4085-93.

12. Boulton ME, Cai J, Grant MB. gamma-Secretase: a multifaceted regulator of angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2008; 12(3): 781-95.
13. Dufraigne J, Funahashi Y, Kitajewski J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene* 2008; 27(38): 5132-7.
14. Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* 2009; 16(2): 196-208.
15. He M, Su H, Gao W, Johansson SM, Liu Q, Wu X, et al. Reversal of obesity and insulin resistance by a non-peptidic glucagon-like peptide-1 receptor agonist in diet-induced obese mice. *PLoS One* 2010; 5(12): e14205.
16. Paris D, Quadros A, Patel N, DelleDonne A, Humphrey J, Mullan M. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by beta and gamma-secretase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2005; 514(1): 1-15.
17. Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, Jung CK, Volbracht C, Steiner H, et al. Gamma-secretase inhibition reduces spine density in vivo via an amyloid precursor protein-dependent pathway. *J Neurosci* 2009; 29(33): 10405-9.
18. Portelius E, Zhang B, Gustavsson MK, Brinkmalm G, Westman-Brinkmalm A, Zetterberg H, et al. Effects of gamma-secretase inhibition on the amyloid beta isoform pattern in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 2009; 6(5-6): 258-62.
19. Khazaei M, Nematbakhsh M. Serum level of vascular endothelial growth factor is increased by estrogen replacement therapy in normotensive and DOCA-Salt hypertensive ovariectomized rats. *Clin Chim Acta* 2006; 365(1-2): 206-10.
20. Silha JV, Krsek M, Sucharda P, Murphy LJ. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29(11): 1308-14.
21. Belo VA, Souza-Costa DC, Luizon MR, Izidoro-Toledo TC, Lanna CM, Pinheiro LC, et al. Vascular endothelial growth factor haplotypes associated with childhood obesity. *DNA Cell Biol* 2011; 30(9): 709-14.
22. Wada H, Ura S, Kitaoka S, Satoh-Asahara N, Horie T, Ono K, et al. Distinct characteristics of circulating vascular endothelial growth factor-a and C levels in human subjects. *PLoS One* 2011; 6(12): e29351.
23. Gu JW, Young E, Patterson SG, Makey KL, Wells J, Huang M, et al. Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice. *Cancer Biol Ther* 2011; 11(10): 910-7.
24. Vucenik I, Stains JP. Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1271: 37-43.

Effects of DAPT on Serum Vascular Endothelial Growth Factor and Its Soluble Receptor in Obese BALB/C Mice

Hajar Saeidi¹, Niloofar Shabanikia¹, Elmira Kalantari¹, Zoya Tahergorabi MSc²,
Majid Khazaei MD, PhD³

Abstract

Background: Today, obesity is considered as a risk factor for tumor growth. Angiogenesis is involved in physiological conditions like wound repair and pathological states such as tumor growth. Gamma-secretase is an enzyme that is involved during angiogenesis process. This study aimed to investigate the effects of DAPT on serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptor (VEGFR1) in obese BALB/c mice.

Methods: A total number of 12 BALB/c mice were purchased from Pasteur Institute (Tehran, Iran). Obesity was induced by feeding the mice on a high-fat diet (HFD) for 20 weeks. The animals were then randomized into two groups of HFD and HFD plus DAPT. In the second group, 10 mg/kg/day of subcutaneous DAPT was administered for 14 days. Afterward, blood samples were obtained and serum VEGF and VEGFR1 levels were measured. Body weights were measured every week.

Findings: DAPT could not significantly change body weight. Moreover, the two groups were not significantly different in terms of serum VEGF concentrations. However, serum VEGFR1 levels were significantly lower in mice receiving DAPT than in the HFD group.

Conclusion: Since DAPT alters serum VEGFR1, it may be involved during angiogenesis and inhibition of tumor growth.

Keywords: Obesity, Vascular endothelial growth factor, High-fat diet

* This paper is derived from a medical doctorate thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

¹ Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

² PhD Student, Department of Physiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Majid Khazaei MD, PhD, Email: khazaei@med.mui.ac.ir