

اثر مواجهه با پرفلئورواکتانویک اسید در دوران بارداری بر تراکم بافت میلین جسم پینه‌ای مغز نوزاد موش صحرائی

جمال چناری^۱، فرهاد گلشن ایرانپور^۲، ناظم قاسمی^۱

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اختلال در فرایند میلین‌سازی به دلیل مواجهه با پرفلئورواکتانویک اسید (PFOA یا Perfluorooctanoic acid) می‌تواند منجر به بروز اختلالات حرکتی شود. در مطالعه‌ی حاضر، اثرات مواجهه با PFOA در دوران بارداری بر تخریب بافت میلین مغز نوزاد موش صحرائی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: موش‌های بارور با نژاد Wistar به صورت تصادفی در پنج گروه شامل گروه‌های شاهد، شم (Sham) و سه گروه دریافت‌کننده PFOA با دزهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، تقسیم شدند. در پایان مطالعه، مغز موش‌های نوزاد ۲۰ روزه خارج شد و با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های لوکسال فست‌بلو و ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد واکاوی قرار گرفت.

یافته‌ها: میانگین تراکم میلین در گروه دریافت‌کننده PFOA با دز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که مواجهه با PFOA در زمان حاملگی، می‌تواند منجر به اختلال در فرایند ساخت میلین شود. از این رو، پیشنهاد می‌شود در دوران بارداری از مواجهه با عوامل توکسیک نظیر PFOA اجتناب گردد.

واژگان کلیدی: پرفلئورواکتانویک اسید؛ پروتئین میلین؛ جسم پینه‌ای

ارجاع: چناری جمال، گلشن ایرانپور فرهاد، قاسمی ناظم. اثر مواجهه با پرفلئورواکتانویک اسید در دوران بارداری بر تراکم بافت میلین جسم پینه‌ای مغز نوزاد موش صحرائی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۳۰): ۴۶۹-۴۶۴.

مقدمه

آسیب‌های پیش‌رونده‌ی سیستم عصبی مرکزی به دلیل ابتلا به بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی بافت میلین، منجر به بروز ناتوانی‌های حرکتی در بالغین جوان می‌شود. تخریب پیش‌رونده‌ی بافت میلین به دلیل مرگ سلول‌های میلین‌ساز، می‌تواند به دنبال نفوذ عوامل سمی در بافت عصبی عارض شود (۱-۲). از جمله‌ی این عوامل، می‌توان به پرفلئورواکتانویک اسید اشاره کرد. این ترکیب با نام اختصاری PFOA (Perfluorooctanoic acid) و با ساختار شیمیایی $C_8H_{15}O_2$ به دلیل داشتن گروه‌های هیدروفل و هیدروفوب، فراوان‌ترین ترکیب سورفکتانت از خانواده‌ی Perfluorinated compounds (PFCs) محسوب می‌شود و در طبیعت، به عنوان یک آلایندگی ماندگار معرفی شده است (۳-۴). PFOA، به طور وسیع در صنعت تولید ظروف بسته‌بندی مواد غذایی مورد استفاده قرار

می‌گیرد (۵-۶). از آن جایی که ایران پنجمین کشور مصرف‌کننده‌ی ظروف یک بار مصرف در جهان است و همچنین، تا زمان انجام این مطالعه، هیچ‌گونه روش مؤثری برای حذف PFOA ابداع نشده بود، بررسی عوارض احتمالی ناشی از ورود این ترکیب به بدن انسان، ضروری به نظر می‌رسد. نتایج مطالعات حاکی از آن است که PFOA در بدن به راحتی متابولیزه نمی‌شود و به دلیل تجمع در بافت کلیه (۷)، نیمه‌ی عمر بالایی دارد (۸-۹). نتایج مطالعات انجام شده در بافت عصبی، نشان می‌دهد که PFOA با دز $7/8$ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن موش، می‌تواند باعث اختلالات حافظه‌ای، حساسیت کولینرژیک، کاهش فعالیت Ambulatory و پاسخ‌های پراکتیویته به نیکوتین شود (۱۰). همچنین، این ترکیب، می‌تواند با تغییر در سطوح برخی از پروتئین‌ها (۱۰)، باعث بروز آلزایمر، مشکلات حرکتی، مشکلات زبانی، سندرم داون و

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

نویسنده‌ی مسؤو: ناظم قاسمی؛ دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

آب‌دهی نمونه‌ها، محلول لوکسال فست بلوی ۰/۱ درصد به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد، محلول کربنات لیتیم ۰/۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و محلول کرزیل ویولت به مدت ۴۰-۳۰ ثانیه مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت، نمونه‌ها شستشو داده شد و پس از مونت کردن با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۵ فیلد از هر اسلاید انتخاب شد و بعد از عکس‌برداری با استفاده از نرم‌افزار Image J میانگین تراکم میلین در هر گروه گزارش گردید.

تکنیک ایمنو‌هیستوشیمی: جهت بررسی میانگین تراکم بافت میلین، بازیابی آنتی‌ژنی با استفاده از بافر سترات انجام شد و سپس، اینکوبه کردن نمونه‌ها با استفاده از آنتی‌بادی‌های اولیه Anti MBP (abcam) به مدت یک شبانه‌روز و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. بعد از شستشوی نمونه‌ها با Phosphate buffered saline (PBS)، آنتی‌بادی ثانویه متصل به (FITC) Fluorescein isothiocyanate (abcam) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق استفاده شد. در پایان، هسته‌ی سلول‌ها با استفاده از 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) رنگ‌آمیزی شد و نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت، با استفاده از نرم‌افزار Image J، میانگین تراکم میلین در هر گروه گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج این مطالعه با استفاده از آزمون One-way ANOVA مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید.

یافته‌ها

بررسی تخریب بافت میلین در رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو: پس از رنگ‌آمیزی مقاطع تهیه شده از جسم پینه‌ای مغز، هسته‌ی سلول‌ها به رنگ آبی و میلین به رنگ سبز و یا مایل به آبی و با شدت نوری متفاوت گزارش شد. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی PFOA، مرز بین جسم پینه‌ای و بافت مجاور، به طور کامل مشخص نمی‌باشد که خود می‌تواند دلیلی بر تخریب بافت میلین در این نواحی باشد.

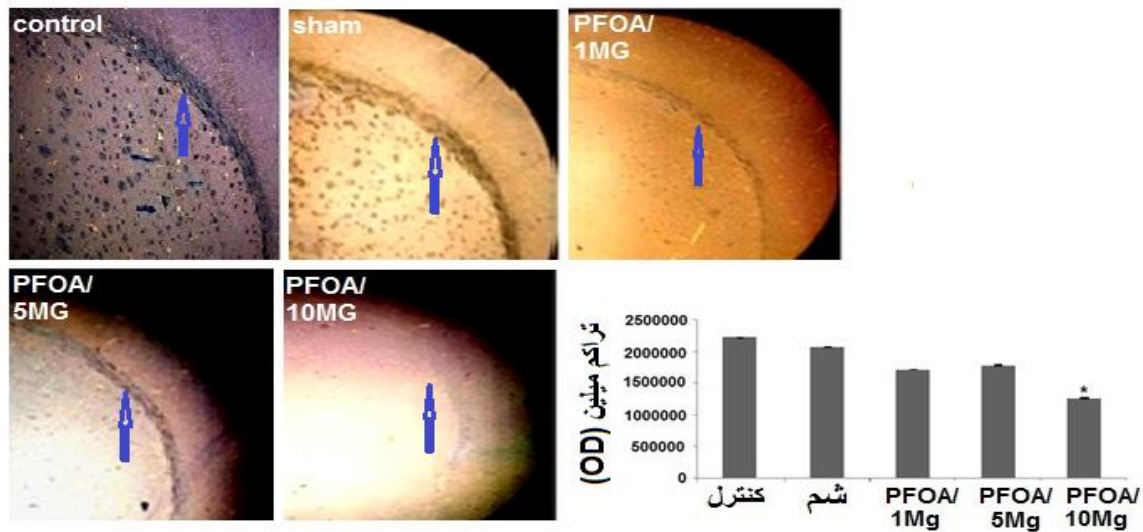
بررسی میانگین تراکم بافت میلین: نتایج ایمنو‌هیستوشیمی نشان داد که PFOA می‌تواند باعث تخریب میلین شود. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، شدت نور در مناطق دمیلینه شده، در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی PFOA نسبت به سایر گروه‌ها کمتر می‌باشد. بررسی تراکم میلین با استفاده از نرم‌افزار Image J نیز نشان داد که میانگین تراکم میلین در جسم پینه‌ای در گروه PFOA ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نسبت به گروه‌های شاهد و شم به صورت معنی‌داری پایین‌تر می‌باشد (شکل ۲). ($P < 0/05$)

اختلالات بینایی شود (۱۱). در بررسی دیگری، تأثیر PFOA بر بیان ژن‌های عصبی در پلاناریا بررسی شده است. نتایج این مطالعه، نشان داده است که PFOA می‌تواند باعث نقص در ساختار نورونی و تغییر سطح بیان ژن‌های مرتبط با سلول‌های عصبی شود (۱۲). افزایش میزان هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدهید، از دیگر اثرات گزارش شده به دلیل مواجهه با PFOA می‌باشد. نتایج مطالعات نشان داده است که فعالیت‌های اکسیداتیوی PFOA از طریق مهار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و کاهش میزان عامل آنتی‌آپوپتوتیک نظیر Bcl2 B-cell lymphoma 2 و افزایش میزان عوامل پروآپوپتوتیک نظیر P53 و Bcl-2-associated X protein (BAX) می‌باشد که می‌تواند منجر به القای آپوپتوز شود (۱۳). به دلیل عدم تجزیه‌ی کامل PFOA و خاصیت ماندگاری بالای آن در محیط و در بدن انسان و با توجه به افزایش روزافزون استفاده از ظروف غذای یک‌بار مصرف به ویژه در ایران و با تکیه بر قدرت عبور راحت PFOA از جفت و سد خونی-مغزی و از آن جایی که تا زمان اجرای این پژوهش، هیچ مطالعه‌ای در زمینه‌ی بررسی اثرات PFOA بر روی بافت میلین انجام نشده بود، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثرات مواجهه با PFOA در دوره‌ی بارداری بر تراکم بافت میلین در مغز نوزادان موش ۲۰ روزه انجام گرفت.

روش‌ها

پژوهش حاضر، نوعی مطالعه‌ی تجربی بود که بر روی ۳۵ موش صحرایی باردار نژاد Wistar در دانشکده‌ی پزشکی اصفهان انجام گرفت. تمام مراقبت‌های حیوانی و روش‌های آزمایشگاهی مطابق با قوانین کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (شماره‌ی 1397.256) رعایت گردید. بعد از ایجاد باروری در موش‌ها به کمک سیستم تریوس و چک کردن پلاک واژینال، موش‌های باردار به شکل تصادفی در پنج گروه ۷ تایی شامل گروه شاهد (بدون هیچ مداخله‌ای)، گروه شم (Sham) (گاواژ ۲ سی‌سی آب مقطر به صورت روزانه)، سه گروه PFOA با دزهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (گاواژ محلول PFOA با دز مشخص از روز اول حاملگی تا پایان دوره‌ی بارداری) تقسیم شدند. در پایان مطالعه، بعد از بیهوشی عمیق نوزادان ۲۰ روزه، کرانیوتومی انجام شد و مغز نوزادان خارج و بعد از ثبوت بافتی، مقاطع پارافینی با ضخامت ۶ میکرومتر تهیه گردید و بررسی‌های بافت‌شناسی انجام شد.

رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو: به منظور بررسی تخریب بافت میلین در کورتکس و جسم پینه‌ای مغز، تعدادی از نمونه‌ها با استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو، مورد بررسی قرار گرفتند. طبق روش انجام شده در مطالعات پیشین (۱۴)، بعد از

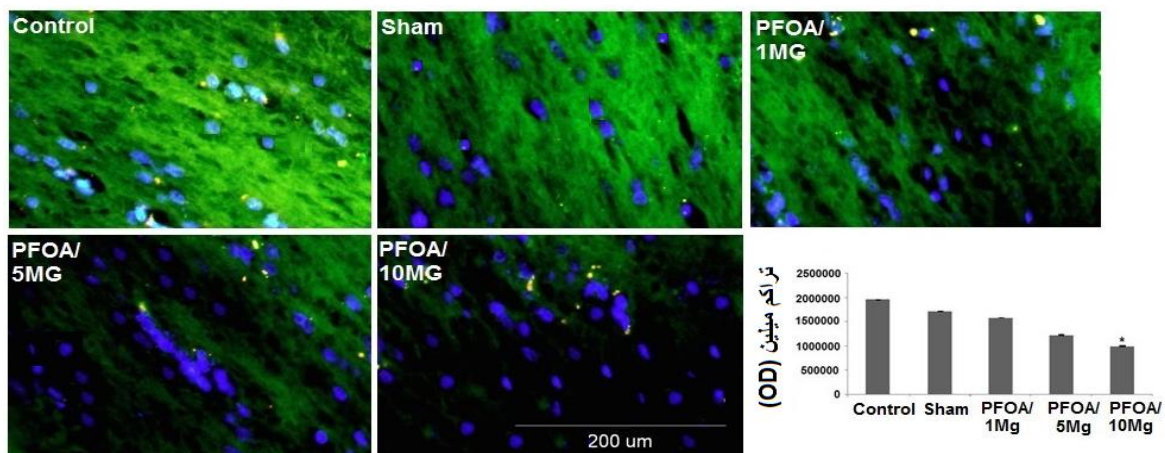


شکل ۱. رنگ آمیزی لوکسال فسٹ بلو. در گروه‌های دریافت کننده PFOA بر خلاف گروه‌های شاهد و شام، مرز کورپوس کالوزوم (رأس فلش) مشخص نمی‌باشد و ضخامت و رنگ کمتری دارد. میانگین تراکم میلین در گروه دریافت کننده PFOA ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نسبت به گروه‌های شاهد و شام به صورت معنی‌داری کاهش دارد ($P < 0/050$) (بزرگ‌نمایی X100).

برابر پروتئین‌های خودی پاسخ نشان دهد (۱۶). وجود Anti-TPO می‌تواند نشانه‌ای از کاهش آستانه‌ی تحمل در سیستم ایمنی باشد که با عملکرد سلول‌های T تنظیم کننده در ارتباط است. از این رو، افزایش سطح سرمی اتوآنتی‌بادی‌ها، می‌تواند نشانه‌ای از افزایش شاخص ابتلا به بیماری‌های خود ایمنی باشد. در سال ۲۰۱۱، Dewit و همکاران دریافتند که PFOA، می‌تواند باعث کاهش سلول‌های T تنظیم کننده (Treg) شود (۱۷). سلول‌های Treg، نقش مهمی در مهار بیماری‌های خود ایمنی دارند. در مجموع، PFOA از طریق القای پاسخ‌های افزایش حساسیت و افزایش سیتوکین‌ها و القای پاسخ نفوسیت‌های T کمک کننده (T helper)، می‌تواند باعث بروز پاسخ‌های خود ایمنی شود (۱۸).

بحث

PFOA، به عنوان یک تراژون شناسایی شده در مایعات بدن، توانایی ایجاد اختلالاتی نظیر تغییر در تکامل مغز و سایر مشکلات عصبی در دوره‌های پیش و پس از تولد را دارد. در این راستا، گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض PFOA قبل از تولد، مشکلات عصبی - عضلانی، اختلالات عصبی رفتاری و تغییر در جنبه‌های مولکولی رشد مغز را به همراه دارد (۱۰-۱۵). PFOA، علاوه بر اثرات مخرب در بافت عصبی، می‌تواند خاصیت سمی بر روند تکامل سایر قسمت‌های بدن نیز داشته باشد. به عنوان مثال، افزایش سطح اتوآنتی‌بادی‌های ناشی از PFOA، می‌تواند مبین این امر باشد که سیستم ایمنی، ممکن است در



شکل ۲. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی. در گروه‌های دریافت کننده PFOA، میلین (رنگ سبز) رنگ‌پذیری کمتری دارد. به علاوه، میانگین تراکم میلین در گروه دریافت کننده PFOA ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نسبت به گروه‌های شاهد و شام به صورت معنی‌داری کاهش دارد ($P < 0/050$) (بزرگ‌نمایی X100).

گفت که احتمال می‌رود PFOA با توانایی عبور از جفت و از طریق اثرات اکسیدانی، تحریک سیستم ایمنی و تولید اتوانتی‌بادی‌ها، قادر است مرگ سلول‌های سازنده‌ی میلین و تخریب بافت میلین را رقم زند. از این رو، می‌توان PFOA را به عنوان نوعی عامل تراژوژن محیطی و خطرزا در ابتلا به بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی بافت میلین معرفی کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که قرار گرفتن در معرض PFOA در زمان حاملگی، می‌تواند منجر به تخریب بافت میلین و ایجاد مشکلات حرکتی در دوران پس از تولد شود. از این رو، پیشنهاد می‌گردد که در دوران بارداری، تا حد ممکن، از مواجهه با عوامل توکسیک نظیر PFOA اجتناب گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل بخشی از نتایج پایان‌نامه‌ی دانشجویی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۷۳۸۴ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد که نویسندگان بدین وسیله از مسؤلین محترم این دانشگاه قدردانی می‌نمایند.

در مطالعه‌ی حاضر، نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی و لوکسال فست بلوی مقاطع تهیه شده از جسم پینه‌ای مغز، نشان داد که میانگین تراکم میلین در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی PFOA نسبت به سایر گروه‌ها کاهش داشته است. در توجیه نتایج مطالعه‌ی حاضر، می‌توان گفت که احتمال می‌رود PFOA با اثرات اکسیدانی باعث القای مرگ سلول‌های سازنده‌ی میلین شده باشد. به تازگی، خاصیت اکسیدانی PFOA در مطالعات به اثبات رسیده است. از جمله‌ی این موارد، می‌توان به مطالعه‌ی Tang و همکاران اشاره کرد (۱۹). نتایج این مطالعه نشان داده است که PFOA سطح ROS را در سلول افزایش می‌دهد. همان‌طوری که در شکل ۲ دیده می‌شود، کاهش تراکم میلین در گروه دریافت‌کننده‌ی PFOA ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، نسبت به سایر گروه‌ها معنی‌دار بوده است. بنابراین، می‌توان چنین استنباط کرد که رابطه‌ی مستقیمی بین میزان ورودی PFOA به بدن و بروز اختلالات وجود دارد. در راستای مطالعه‌ی حاضر، Loccisano و همکاران نیز نشان دادند که بین سطح سرمی PFOA و سرطان کلیه، رابطه‌ی مستقیمی وجود دارد (۷). همچنین، نتایج مطالعه‌ی نشان داد که بین سطح خونی PFOA و ابتلا به بیماری‌های تخریب‌کننده‌ی بافت میلین، ارتباط مستقیمی وجود دارد (۲۰). در مجموع، در توجیه نتایج این پژوهش، می‌توان

References

- Ghasemi N. Therapeutic effects of adipose derived mesenchymal stem cells on remyelination process in inflammatory demyelinating diseases. *Histol Histopathol* 2015; 2(1): 1-7.
- Kalman B, Lublin FD. Spectrum and classification of inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2001; 1(3): 249-56.
- European Food Safety Authority (EFSA). Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal* 2008; 6(7): 653.
- Goosey E, Harrad S. Perfluoroalkyl compounds in dust from Asian, Australian, European, and North American homes and UK cars, classrooms, and offices. *Environ Int* 2011; 37(1): 86-92.
- Steenland K, Fletcher T, Savitz DA. Epidemiologic evidence on the health effects of perfluorooctanoic acid (PFOA). *Environ Health Perspect* 2010; 118(8): 1100-8.
- Jian JM, Guo Y, Zeng L, Liang-Ying L, Lu X, Wang F, et al. Global distribution of perfluorochemicals (PFCs) in potential human exposure source-A review. *Environ Int* 2017; 108: 51-62.
- Loccisano AE, Longnecker MP, Campbell JL, Andersen ME, Clewell HJ. Development of PBPK models for PFOA and PFOS for human pregnancy and lactation life stages. *J Toxicol Environ Health A* 2013; 76(1): 25-57.
- Brede E, Wilhelm M, Goen T, Muller J, Rauchfuss K, Kraft M, et al. Two-year follow-up biomonitoring pilot study of residents' and controls' PFC plasma levels after PFOA reduction in public water system in Arnsberg, Germany. *Int J Hyg Environ Health* 2010; 213(3): 217-23.
- Seals R, Bartell SM, Steenland K. Accumulation and clearance of perfluorooctanoic acid (PFOA) in current and former residents of an exposed community. *Environ Health Perspect* 2011; 119(1): 119-24.
- Johansson N, Fredriksson A, Eriksson P. Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice. *Neurotoxicology* 2008; 29(1): 160-9.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 2004; 84(2): 361-84.
- Yuan Z, Zhang J, Zhao B, Miao Z, Wu X. Effects of perfluorooctanoic acid on neural genes expression and neuronal morphology in the planarian *Dugesia japonica*. *Chem Ecol* 2016; 32(6): 575-82.
- Chen Y, Zhou L, Xu J, Zhang L, Li M, Xie X, et al. Maternal exposure to perfluorooctanoic acid inhibits luteal function via oxidative stress and apoptosis in pregnant mice. *Reprod Toxicol* 2017; 69: 159-66.
- Bagheri E, Marandi SM, Ghasemi N. Evaluation of

- curcumin effects on improvement of muscle strength, prevention of oligodendrocytes and myelin damage in brain, in an animal model of multiple sclerosis (MS). *Sci J Kurdistan Univ Med Sci* 2018; 23(5): 55-64. [In Persian].
15. Slotkin TA, MacKillop EA, Melnick RL, Thayer KA, Seidler FJ. Developmental neurotoxicity of perfluorinated chemicals modeled in vitro. *Environ Health Perspect* 2008; 116(6): 716-22.
 16. Webster GM, Venners SA, Mattman A, Martin JW. Associations between perfluoroalkyl acids (PFASs) and maternal thyroid hormones in early pregnancy: a population-based cohort study. *Environ Res* 2014; 133: 338-47.
 17. Dewitt J. Immunopathogenesis in autism: Regulatory T Cells and autoimmunity in neurodevelopment. Greenville, NC: East Carolina University; 2011.
 18. Zhu Y, Qin XD, Zeng XW, Paul G, Morawska L, Su MW, et al. Associations of serum perfluoroalkyl acid levels with T-helper cell-specific cytokines in children: By gender and asthma status. *Sci Total Environ* 2016; 559: 166-73.
 19. Tang J, Lu X, Chen F, Ye X, Zhou D, Yuan J, et al. Effects of perfluorooctanoic acid on the associated genes expression of autophagy signaling pathway of *carassius auratus* lymphocytes in vitro. *Front Physiol* 2018; 9: 1748.
 20. Steenland K, Zhao L, Winquist A, Parks C. Ulcerative colitis and perfluorooctanoic acid (PFOA) in a highly exposed population of community residents and workers in the mid-Ohio valley. *Environ Health Perspect* 2013; 121(8): 900-5.

The Effect of Exposure to Perfluorooctanoic Acid during Pregnancy on Myelin Density of Corpus Callosum of Newborn Rat

Jamal Chenari¹, Farhad Golshan-Iranpour², Nazem Ghasemi³

Original Article

Abstract

Background: Disruption of myelination process due to exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) can lead to movement disorders. In the present study, the effects of exposure to PFOA during pregnancy on myelin degradation in brain of newborn rat were investigated.

Methods: Fertile Wistar rats were randomly divided into five groups of control, sham, and three groups receiving PFOA at doses of 1, 5, and 10 mg/kg body weight. At the end of the study, the brains of 20-day-old neonatal rats were removed and examined using loxal fast blue and immunohistochemical staining. Finally, the data were analyzed using SPSS software.

Findings: The mean myelin density in the group receiving PFOA at a dose of 10 mg/kg was significantly lower than the other groups ($P < 0.050$).

Conclusion: The results showed that exposure to PFOA during pregnancy can lead to disruption of myelin production process; so, it is recommended to avoid exposure to toxic agents such as PFOA during pregnancy.

Keywords: Perfluorooctanoic acid; Myelin proteins; Corpus callosum

Citation: Chenari J, Golshan-Iranpour F, Ghasemi N. **The Effect of Exposure to Perfluorooctanoic Acid during Pregnancy on Myelin Density of Corpus Callosum of Newborn Rat.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(630): 464-9.

1- MSc Students, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Nazem Ghasemi, Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: n_ghasemi@med.mui.ac.ir