

ارزیابی سمیت حاد نانوذرات اکسید روی بر عملکرد بیوشیمیایی سرمی کبد در موش سفید آزمایشگاهی

محمد سعید حیدر نژاد^{۱*}، مهدی نجفی^۲، محسن مبینی دهکردی^۳، سمیرا رهنما^۴

^۱گروه جانور شناسی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲گروه فیزیولوژی جانوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛

^۳گروه میکروبیولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۵

چکیده:

زمینه و هدف: با صنعتی شدن نانو تکنولوژی، در معرض قرار گیری عموم با نانو ذرات در آینده نزدیک افزایش خواهد یافت؛ لذا بررسی اثرات دوزهای مختلف این نانوذرات و اثرات آن ها بر سلامتی حائز اهمیت است. این مطالعه با هدف ارزیابی اثر سمیت حاد نانو ذرات اکسید روی بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی کبد در سرم خون موش انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۱۸ سر موش ماده Balb/c به صورت تصادفی در سه گروه، یک گروه شاهد و دو گروه تیمار قرار گرفتند. گروه شاهد در روز اول یک میلی لیتر آب مقطر، ولی گروه های تیمار فقط در روز اول نانوذرات اکسید روی را در غلظت های حاد ۰/۰۵ g/ml و ۰/۱ g/ml دریافت کردند. بعد از ۱۴ روز خونگیری از موش ها انجام شد. غلظت سرمی آنزیم های لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارات آمینوترانسفراز (AST) با استفاده از اتوآنالیزر تعیین شد.

یافته ها: افزایش قابل توجهی در آنزیم های ALP، ALT و AST در گروه دریافت کننده از هر دو غلظت نانو ذرات اکسید روی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (P=۰/۰۱). همچنین غلظت سرمی آنزیم LDH فقط با دوز ۰/۱ g/ml از نانوذرات اکسید روی افزایش معنی داری نشان داد (P=۰/۰۱).

نتیجه گیری: بررسی حاضر نشان داد که سطوح حاد نانوذرات اکسید روی سمی هستند و اثرات مضرشان را بر کبد از طریق افزایش پارامترهای سرمی بیوشیمیایی کبد نشان می دهند؛ لذا در استفاده از این نانوذرات باید احتیاط لازم صورت پذیرد.

واژه های کلیدی: نانوذرات اکسید روی، فاکتورهای بیوشیمیایی سرم، سمیت، کبد.

مقدمه:

می کنند (۴). امروزه پیشرفت تکنولوژی و دستیابی انسان به روش های نوین برای استفاده از منابع طبیعی، دستاوردهایی را به همراه دارد که علاوه بر تأثیرات فراوان در زندگی بشر، اثرات منفی نیز برای طبیعت در پی خواهد داشت (۵)

نانوذرات به علت اندازه منحصر به فردشان با خصوصیات فیزیکوشیمیایی ویژه بسیاری تولید می شوند و بدین وسیله می توانند خطرات پیش بینی نشده ای را برای سلامتی انسان داشته باشند. با افزایش توجه به سمیت بالقوه آن ها، اثرات مضر نانوذرات مهندسی شده به میزان زیادی در آزمایشگاه و در

با گذر از میکرو ذرات به نانوذرات، با تغییر برخی از خواص فیزیکی روبرو می شویم. افزایش نسبت مساحت سطحی به حجم و ورود اندازه ذره به قلمرو اثرات کوانتومی، دو مورد مهم از این خواص هستند. افزایش نسبت مساحت سطحی به حجم که به تدریج با کاهش اندازه ذره رخ می دهد، باعث غلبه یافتن رفتار اتم های واقع در سطح ذره به رفتار اتم های درونی می شود. این پدیده بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ذره اثر می گذارد (۴-۱). به محض آن که ذرات به اندازه کافی کوچک شوند، شروع به رفتار مکانیک کوانتومی و خواص جدید

جدول شماره ۱: مشخصات نانو ذرات اکسید روی

استفاده شده در این مطالعه

ZnO (Zinc Oxide)	نوع نانو ذره
+۹۹	درصد خلوص
۱۰-۳۰ nm	اندازه نانو ذره
۶۰-۲۰۰ m ² /g	سطح ویژه
سفید شیری	رنگ
Single	فاز کریستالی
نزدیک به کروی	شکل کریستالی
۵/۶۰۶ g/cm ³	چگالی واقعی

در این مطالعه تعداد نمونه با استفاده از فرمول کوکران ۱۷ سر موش برآورد شد؛ لذا برای انجام مطالعه از ۱۸ سر موش ماده بالغ استفاده شد و موش ها به صورت تصادفی در سه قفس به صورت سه گروه شش تایی، یک گروه شاهد و دو گروه تیمار قرار گرفتند. موش ها در طی مراحل آزمایش در خانه حیوانات دانشگاه شهرکرد در دمای حدود ۲۰ درجه سانتی گراد با دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند.

در آماده سازی سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی برای ایجاد سمیت حاد نانوذرات اکسید روی به صورت خوراکی، غلظت ۵ گرم روی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مورد استفاده قرار گرفت (۱۰). با توجه به این که میانگین وزن موش ها حدود ۲۰ گرم بود، ۰/۱ گرم نانوذرات اکسید روی در ۱ میلی لیتر آب مقطر به ازای هر موش به صورت سوسپانسیون تهیه و به روش خوراکی تجویز شد. لازم به ذکر است که قبل از شروع آزمایش، میانگین و انحراف استاندارد وزن موش ها در هر سه گروه اندازه گیری شد و تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ($P > 0/05$). یک روز قبل از تیمار موش ها در شرایط گرسنگی و تشنگی قرار داده شدند. در روز بعد به موش های گروه تیمار غلظت های مختلف نانو ذرات

محیط طبیعی مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات آزمایشگاهی نیز پاسخ های فیزیولوژیکی شناخته شده در اکثر نمونه های جانوری را حمایت کرده است و به علاوه اطلاعاتی را فراهم نموده که بیانگر افزایش وقوع استرس اکسیداتیو در سلول های در معرض قرار گرفته با نانوذرات گوناگون می باشد (۶).

نانو ذرات اکسید روی به خاطر خصوصیات منحصر به فرد نوری، کاتالیکی، نیمه هادی، پیزو الکتریک و مغناطیسی به طور گسترده تولید و از نظر تکنولوژیکی کاربرد دارند (۷) و به طور گسترده ای در وسایل الکترونیکی نوری، لوازم آرایشی، کاتالیزورها، سرامیک ها، رنگدانه ها و غیره به کار می روند. گزارشات اخیر نیز مطرح می کنند که نانو ذرات اکسید روی زیست ایمن و زیست سازگار بوده و می توانند در مواد زیست پزشکی به کار برده شوند. با این حال برخی مطالعات سمیت شناسی نشان می دهند که نانو ذرات از جمله نانوذرات اکسید روی می توانند عوارض جانبی نیز بر روی سلامتی انسان و گونه های زنده داشته باشند (۸). لذا با توجه به آنکه ایمنی زیستی این نانو ذرات هنوز یک مسئله بحث برانگیز است (۹) و این نانو ذرات (اکسید روی) به میزان فراوان به روش صنعتی تولید و می توانند از مسیرهای گوناگون وارد بدن انسان شوند؛ در این مطالعه سمیت حاد نانو ذرات اکسید روی بر غلظت آنزیم های کبدی موش آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی، نانو ذرات اکسید روی با مشخصات معین (جدول شماره ۱) به صورت پودر از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان واقع در مشهد خریداری شدند.

داده ها، از آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس آزمون دانکن در نرم افزار SPSS برای تجزیه و تحلیل داده ها استفاده شد. اختلاف معنی داری بین گروه ها $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها:

آنزیم LDH در گروه های دریافت کننده ی دوز $0/05 \text{ g/ml}$ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان نداد؛ اما در گروه های دریافت کننده دوز $0/1 \text{ g/ml}$ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی دار مشاهده شد ($P=0/01$). غلظت سرمی آنزیم های AST، ALP و ALT در گروه های دریافت کننده ی دوز $0/1 \text{ g/ml}$ و $0/05 \text{ g/ml}$ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0/05$) (جدول شماره ۲). همچنین در طی تیمار با نانو ذرات اکسید روی، نشانه های مرگ و میر مشاهده شد که در گروه دریافت کننده ی دوز حداکثر ($0/1 \text{ g/ml}$)، این مرگ و میر فراوان تر بود.

اکسید روی که در یک میلی لیتر آب مقطر حل شده بود با غلظت حداقل $0/05 \text{ g/ml}$ و غلظت حداکثر $0/1 \text{ g/ml}$ بصورت دهانی و از طریق گاوژ دریافت نمودند. برای غلظت $0/05 \text{ g/ml}$ ، 500 میلی لیتر از محلول نانو ذرات اکسید روی و برای $0/1 \text{ g/ml}$ ، 1000 میلی لیتر از محلول نانو ذرات اکسید روی به موش های گروه های آزمایشی خوراندند. پس از تیمار، موش ها روزانه به مدت دو هفته مورد مشاهده قرار گرفتند. نشانه های مرگ و میر در طول مدت تیمار مورد بررسی قرار گرفت و بعد از این مدت، از قلب موش ها برای بررسی سطح آنزیم های کبدی، خون گیری به عمل آمد.

سنجش بیوشیمیایی سرم از طریق سانتریفوژ خون در 3000 rpm به مدت 15 دقیقه به دست آمد. سطح برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم مانند لاکتات دهیدروژناز (LDH)، آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) توسط اتوآنالایزر سنجیده شد (۲). در تجزیه و تحلیل آماری قبل از آنالیز، داده ها نرمال سازی شدند و با توجه به توزیع نرمال

جدول شماره ۲: غلظت سرمی آنزیم های کبدی در گروه شاهد و گروه های تجربی دریافت کننده نانو ذرات اکسید روی

پارامترها	گروه شاهد	گروه تیمار با غلظت $0/05 \text{ g/ml}$	گروه تیمار با غلظت $0/1 \text{ g/ml}$
LDH (U/L)	$371 \pm 60/2$	$419/2 \pm 53/35$	$825/6 \pm 129/85^{a,b}$
ALP (U/L)	$69 \pm 23/7$	$114/33 \pm 27/4^a$	$120 \pm 38/3^a$
ALT (U/L)	$12/83 \pm 1/47$	$15/16 \pm 0/75^a$	$18 \pm 0/9^{a,b}$
AST (U/L)	$52/8 \pm 9/78$	$95/4 \pm 39/96^a$	$111/4 \pm 27/86^a$

یافته ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار می باشند؛ a : نشان دهنده تفاوت معنی دار بین هر یک از گروه های تیمار با گروه شاهد در سطح $P < 0/05$ ؛ b : نشان دهنده تفاوت معنی دار بین دو گروه تیمار در سطح $P < 0/05$ ؛ LDH: لاکتات دهیدروژناز؛ ALT: آلانین آمینو ترانسفراز؛ AST: آسپاراتات آمینو ترانسفراز؛ ALP: آلکالین فسفاتاز.

بحث:

در واقع این مواد به علت ماندگاری در محیط و زنجیره غذایی مسمومیت هایی را ایجاد می نمایند

آلودگی های ناشی از نانو ذرات امروزه به عنوان مساله ای جدید و خطرناک مطرح شده اند.

(۱۴-۱۱). در پژوهش حاضر اثر سمیت نانو ذرات اکسید روی به علت کاربرد زیاد آن ها در صنایع مختلف بررسی شد و نتایج به دست آمده در بررسی تأثیر مقادیر مختلف نانو ذرات اکسید روی بر میزان آنزیم های کبدی نشان داد که نانو ذرات اکسید روی در دوز بالا (۰/۱ g/ml) باعث افزایش معنی داری در غلظت های این آنزیم ها می شوند.

آنزیم ALT برای کبد اختصاصی بوده و آسیب سلول های کبدی باعث افزایش آزاد شدن این آنزیم می گردد؛ بنابراین دلیل افزایش آنزیم ALT در این مطالعه، به علت اثر تخریبی نانو ذرات اکسید روی بر سلول های کبدی بوده است. همچنین انسداد مجاری صفراوی باعث افزایش غلظت سرمی آنزیم ALP می گردد. از این رو احتمالاً با توجه به تخریب سلول های کبدی و انسداد مجاری صفراوی غلظت ALP افزایش یافته است.

در این مطالعه همچنین افزایش غلظت آنزیم های AST و ALP مشاهده شد؛ که ممکن است به دلیل افزایش آنابولیسیم یا کاهش کاتابولیسیم آن ها باشد (۱۵). ثبات و درستی غشای هپاتوسیت ها لازمه ی اعمال حیاتی کبد می باشد. نانو ذرات اکسید روی با توجه به خصوصیات فیزیکی شیمیایی که دارند این ثبات را بر هم زده و موجب بروز اختلال در عملکرد کبد می گردند. مطالعات زیادی روی خصوصیات فیزیکی شیمیایی نانو ذرات صورت گرفته است. به عنوان مثال تحقیقات نشان داده اند که نانو ذرات نقره دارای اثرات سمی، روی سلول های ماهی ها هستند (۱۶). همچنین نانو ذرات به دلیل دارا بودن خصوصیات فیزیکی شیمیایی، قابلیت زیست و تکثیر سلول های زنده را کاهش می دهند (۱۷، ۱۸). از نظر تئوری انتظار می رود که نانو ذرات نسبت به ترکیبات توده ای آن ها به خاطر فعالیت های سطحی خیلی زیاد و توانایی آن ها در نفوذ به داخل و تجمع در درون سلول ها و موجودات

زنده سمی باشند (۱۹). داده های تجربی نشان می دهند که استرس اکسیداتیو می تواند یک مسیر کلیدی در القای سمیت سلولی نانو ذرات اکسید روی در سلول های سرطانی روده بزرگ انسانی باشد (۲۰). در معرض قرارگیری با غلظت بسیار زیاد و حاد نانو ذرات پودر روی (Zn) و ترکیبات آن به صورت خوراکی عموماً منجر به آسیب گوارشی می شود. خوردن میزان زیاد روی (Zn) به مدت چندین ماه می تواند باعث کم خونی، آسیب پانکراس و کاهش سطح لیپو پروتئین با چگالی بالا (HDL) شود (۱۰). بررسی سمیت نانو ذرات اکسید روی بر کشت سلول های عصبی پستانداران نیز نشان داده است که این نانو ذرات منجر به غیر طبیعی شدن سلول ها از نظر اندازه، نمایش انقباض سلولی و جدا شدن از ظرف محیط کشت می شوند. همچنین این نانو ذرات باعث کاهش قابل توجه عملکرد میتوکندریایی و افزایش قابل ملاحظه نشت LDH شده اند (۲۱). در دیگر مطالعات، بررسی سمیت نانو ذرات اکسید روی بر کشت سلول های فیروبلاستی جنین موش نشان داده است که این نانو ذرات، نشت LDH را در سلول اولیه فیروبلاستی موش القا می کنند و بر روی یکپارچگی غشای سلولی موثر می باشند (۶). مشاهدات میکروسکوپی نیز نشان داده اند که نانو ذرات به سطح سلول متصل شده و بعضی نانو ذرات به درون سلول ها راه می یابند. این الگوی اتصال در ظاهر بسته به نوع نانو ذرات اکسید فلزی متفاوت است (۲۱). به طور کلی سمیت نانو ذرات به اندازه کوچک و ناحیه سطحی ویژه بسیار بزرگ آن ها مرتبط است.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه سمیت نانو ذرات اکسید روی را تأیید نمود و نشان داد که تجویز نانو ذرات اکسید روی در غلظت حاد به روش خوراکی

تشکر و قدردانی:

از کلیه افرادی که به هر نحو در انجام این تحقیق ما را حمایت کردند، به ویژه پرسنل محترم آزمایشگاه فارماکولوژی دانشگاه شهرکرد تشکر و قدردانی می گردد.

می تواند به واسطه افزایش نشت آنزیم های ALP، AST و LDH از سلول ها کبدی و افزایش سطح سرمی آن ها، باعث مسمومیت موش ها از طریق ایجاد اختلال در عملکرد کبد و آسیب سلول های کبدی شود. با این حال مطالعات بیشتری جهت پیش بینی اثرات این ماده پیشنهاد می گردد.

منابع:

1. Erb U, Aust KT, Palumbo G. In nanostructured materials. processing, properties and potential applications. Noyes: New York; 2002; p. 179-222.
2. Goddard WA, Brenner DW, Lyshevski SE, Iafate GJ. Handbook of nanoscience, engineering, and technology. Boca Raton: CRC; 2003.
3. Mulvaney P. In nanoscale materials in chemistry. Wiley: New York; 2001.
4. Alivisatos AP. Semiconductor clusters, nanocrystals and quantum dots. Science 1996; 271(5251): 933-9.
5. Buzea C, Pacheco, II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. Biointerphases. 2007; 2(4): MR17-71.
6. Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. J Appl Toxicol. 2009 Jan; 29(1): 69-78.
7. Li LZ, Zhou DM, Peijnenburg WJ, Gestel C A, Jin SY, Wang YJ, et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticle in the earthworm, Eisenia fetida and subcellular fractionation of Zn. Environ Int. 2011; 37: 1098-1104.
8. Afkhami-Ardakani M, Shirband A, Golzade J, Asadi-Samani M, Latifi E, Kheylapour M et al . The effect of iron oxide nanoparticles on liver enzymes (ALT, AST and ALP), thyroid hormones (T3 and T4) and TSH in rats. J Shahrekord Univ Med Sci. 2013; 14 (6): 82-88
9. Bai W, Zhang Z, Tain W, He X, Ma Y, Zhao Y. and Chai Z. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism . J Nanopar Res. 2010; 12: 1645-1654.
10. Wang B, Feng WY, Wang TC, Jia G, Wang M, Shi JW, et al. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. Toxicol Lett. 2006 Feb 20; 161(2): 115-23.
11. Shi JW, Zhang F, Zhao YL, Chai ZF. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. Toxicology Lett. 2006; 161(2): 115-23.
12. Zhang XD, Wu HY, Wu D, Wang YY, Chang JH, Zhai ZB, et al. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. Int J Nanomedicine. 2010; 5: 771-81.
13. Revell PA. The biological effects of nanoparticles. Nanotechnology Perceptions 2006; 2: 283-98.
14. Peter HH, Irene BH, Oleg VS. Nanoparticles-known and unknown health risks. J Nanobiothechnol. 2004; 2(1): 12-27.
15. Christ-Crain M, Meier CPuder J, Staub J, Huber P ,Keller U. Changes in liver function correlate with the improvement of lipid profile after restoration of euthyroidism in patients with subclinical hypothyroidism. Excli J. 2004; 3: 9.
16. Wise JP, Sr Goodale BC, Wise SS, Craig GA, Pongan AF, Walter RB, et al. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. Aquat Toxicol. 2010 Apr; 97(1): 34-41.
17. Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. J Toxicol Environ Health Part A. 2003; 66(20): 1909-26.

18. Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett.* 2005 Mar 15; 155(3): 377-84.
19. Xiong D, Fang T, Yu L, Sima X, Zhu W. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci Total Environ.* 2011 Mar 15; 409(8):1444-52.
20. Berardis BD, Civitelli G, Condello M, Lista P, Pozzi R, Arancia G, et al. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol. Appl Pharmacol.* 2010; 246: 116-127.
21. Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health Part A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2006; 41(12): 2699-711.

An assessment of acute oral toxicity of ZnO nanoparticles on serum biochemical function of liver in mice

Heydarnejad MS^{1*}, Najafi M², Mobini- Dehkordi M³, Rahnama S²

¹Zoology Dept., Shahrekod University, Shahrekod, I.R. Iran; ²Animal Physiology Dept., Shahrekod University, Shahrekod, I.R. Iran; ³Microbiology Dept., Shahrekod University, Shahrekod, I.R. Iran

Received: 31/Jan/2013

Accepted: 15/June/2013

Background and aims: With the industrialization of the nanotechnology, public exposure to nanoparticles will increase in the near future. So, health impacts of nanoparticles have rarely been studied. The main aim of this study was to assess acute toxicity of ZnO nanoparticles (ZnO-NPs) on serum biochemical function of liver in mice (*Mus musculus*).

Methods: In this experimental study, a group of 18 BALB/c mice was randomly divided into three groups: two ZnO-NPs mice groups and one control group. The first day of the experiment, ZnO-NPs were received orally in acute doses of 0.05 g/ml and 0.1g/ml in the experimental groups, while in the untreated (control) group, no ZnO-NPs were used and they received distilled water 1 g/ml. The experiment lasted for 14 days. The serum was obtained by centrifugation of the whole blood at 3000 rpm for 15 min. Serum concentration of lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) was assayed using auto analyzer system.

Results: The present study showed that both doses of ZnO-NPs increased significantly ALP, ALT, and AST enzymes compared with the control ($P=0.01$). However, LDH elevated in mice treated just with ZnO-NPs with a dose of 0.1g/ml. This showed that ZnO-NPs at acute doses could induce a severe liver damage ($P=0.01$).

Conclusions: The current study results show that acute levels of ZnO-NPs are toxic and have harmful effects on liver function as indicated by increased levels of biochemical serum parameters of liver. Therefore, it is necessary to be cautious in the use of these nanoparticles.

Key words: Nano-ZnO, Serum biochemical factors, Toxicity, Liver.

Cite this article as: Heydarnejad MS, Najafi M, Mobini- Dehkordi M, Rahnama S. An assessment of acute oral toxicity of ZnO nanoparticles on serum biochemical function of liver in mice. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014 Apr, may; 16(1): 65-71.

***Corresponding author:**

Zoology Dept., Shahrekord University, Shahrekord, I.R. Iran. Tel: 00989173083810,
E-mail: m_heydarnejad@yahoo.com