Archive of SID

مقاله پژوهشی

فصلنامهٔ بیماری‌های پستان ایران، سال پنجم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۱

بررسی اثر سمیت سلولی آرتمیزینین نانونیوزومه بر رده سلول‌های سرطانی سینه

الناز اصغرخانی [۱]: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
عظیم اکبرزاده: انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی
محسن چیانی: انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی
شیوا ایرانی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
سیدمحمد اطیابی: انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی
داریوش نوروزیان: انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت نانوبیوتکنولوژی

چکیده

مقدمه: سرطان سینه از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان ایرانی محسوب می‌شود و سالانه ۷ هزار زن به این سرطان مبتلا می‌شوند. آرتمیزینین دارویی است گیاهی که به تنهایی قادر به از بین بردن انتخابی سلول‌های سرطانی است و بر سلول‌های طبیعی اثر سویی ندارد. نیوزوم‌ها حاملین زیست تخریب‌پذیر، غیرسمی و کارآمدی برای تحویل هدفمند داروها هستند. هدف از این مطالعه تهیه فرمولاسیون نیوزومی داروی آرتمیزینین و بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی این فرمولاسیون بر روی رده سلول سرطانی سینه انسانی(MCF-7) است.

مواد و روش‌ها: برای تهیه نیوزومهای آرتمیزینین از روش تبخیر فاز معکوس و تزریق اتر استفاده شد. برای این منظور مقادیر مشخصی از span20، آرتمیزینین و کلسترول در اتانول حل گردید و پس از تبخیر حلال با کمک روتاری اواپوریتور، فاز ژلوزی بدست آمده در بافر فسفات(pH 7.4) حل گردید و سپس به کمک سونیکاتور همگن سازی شد. قطر متوسط نیوزوم‌های آرتمیزینین با دستگاه زتاسایزر اندازه گیری شد. اثر سایتوتوکسیسیتی با روش MTT assay مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: قطر متوسط نیوزومها در روش تزریق اتر ۳±۲۲۰ و در روش تبخیر فاز معکوس برابر با ۵±۲۶۷ نانومتر تعیین شد. بازده کپسوله شدن دارو روش تزریق اتر ۲±۸۶/۳ و در روش تبخیر فاز معکوس برابر با ۳±۹۲/۴ درصد بدست آمد و اثر سایتوتوکسیسیتی (IC50) داروی نیوزومه بر روی سلول‌های سرطانی بیشتر از فرم معمولی دارو بود.

بحث و نتیجه گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از حامل‌های دارو رسانی مانند نیوزومها نقش موثری در افزایش کارایی دارو و کاهش دوز مصرفی آن دارد.

واژه‌های کلیدی: نیوزوم، سایتوتوکسیسیتی، آرتمیزینین،MCF-7.

[۱] نشانی نویسنده پاسخگو: تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت نانو بیوتکنولوژی، الناز اصغرخانی. نشانی الکترونیک: e.asgharkhany@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

هدف یک سیستم تحویل دارویی هدفمند، افزایش تحویل دارو در منطقه مورد نظر و کاهش اثر آن بر بافت‌های غیرهدف است به گونه‌ای که یک حالت پایدار را در خون ایجاد کند و یا در بافت هدف، سطحی از درمان را که موثرتر و غیرسمی‌تر باشد و مدت زمان طولانی‌تر را شامل شود را ایجاد کند که در این راستا، طراحی یک دوز مناسب دارویی، عنصر مهم در رسیدن به این هدف هستند(۱). سرطان پستان در کل جهان پنجمین علت مرگ ناشی از سرطان بعد از سرطان ریه، معده، کبد و کولون است(۲).

نیوزوم‌ها وزیکول‌های سورفکتانت‌های غیریونی با ساختارهای میکروسکوپی لایه‌لایه هستند که از هیدرتاسیون کلسترول با سورفکتانت‌های غیر یونی در محیط آبی تهیه می‌شوند و از سیستم‌های مهم دارو رسانی می‌باشند. در مقایسه با روش‌های دیگر دارورسانی هدفمند مثل لیپوزوم‌ها، نیوزومها دارای مزیت‌های زیادی هستند که از آن جمله می‌توان به روش‌های تهیه آسان‌تر، هزینه تولید پائین‌تر، انعطاف پذیری ساختاری و سمیت پایین‌تر به دلیل طبیعت غیر یونی آنها اشاره کرد. علاوه براین نیوزمها زیست سازگار، زیست تخریب پذیر و غیر ایمنی‌زا بوده و با طیف وسیع‌تری در اندازه‌های ۱۰۰-۱۰ نانومتر قابل تهیه هستند. از لحاظ حلالیت، نیوزومها طیف وسیع‌تری از داروها شامل داروهای هیدروفیل(در داخل یک فاز آبی) و لیپوفیل(در ناحیه به خصوصی در بیرون لایه‌های چربی) را به دام می‌اندازند(۳).

Srinivas و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعات خود فرمول نیوزومال aceclofenac را گسترش داد. جهت بهتر کردن امکان دسترسی در مطالعات ارزیابی خود اثرات تغییر ترکیب سورفکتانت‌های غیریونی وکلسترول را در ظرفیت کپسوله شدن، اندازه ذرات و رهاسازی دارو را مورد مطالعه قرار دادند. برای این کار از مدل Peppas استفاده کردند(۴).

آرتیمیزین دارای گروه لاکتون پراکسید در ساختار خود است و تصور می‌شود زمانی که پراکسید در ساختار ماده‌ای باشد در تماس با غلظت بالای آهن(مثل سلول‌های سرطانی) باعث رهاسازی گونه‌های اکسیژن فعال و ناپایدار شدن مولکول می‌شود و سلول‌های سرطانی به دلیل کمبود آهن از بین می‌روند(۵).

پ. سینگ و همکاران(۲۰۰۴) القا آرتمیزینین بر روی سلول‌های سرطانی انسان را بررسی کردند. در مقایسه با سلول‌های نرمال، سلول‌های سرطانی سطح سلولی بیشتری برای گیرنده‌ها دارند. آنها آهن را به کمک پروتئین‌های گیرنده آهن می‌گیرند. پس سلول‌های سرطانی بیشتر تحت تاثیر کمبود آهن قرار گرفته و نابود می‌شوند(۶).

یانگ لی و همکاران(۲۰۰۱) اثرات ضد سرطانی مشتقات آرتیمیزنین در فاز G1 چرخه سلولی بررسی کردند. با اصلاح ساختار آرتمیزینین یک سری مواد جدید کشف کردند که این مشتقات شامل گروه‌های سیانو و آریل است که تاثیرات قوی بر علیه رشد سلول‌های کشت شده P388 سرطان خون موشی و A549 سرطان ریه انسانی بدخیم داشتند. این فعالیت‌ها با تجمع در فازG1 سلول‌های سرطان خون موشی باعث مرگ آنها گردید(۷).

به همین دلیل از ترپنوئیدها و فلاونوئیدهای متعدد استخراج شده از این گیاه که دارای فعالیت ضد سلولی (سایتوتوکسیک) و ضد تومور هستند استفاده می‌شود. از دیگر اثرات آرتمیزینین و مشتقات آن، فعالیت آنها بر علیه سلول‌های سرطانی سینه است که دارای اثر کشندگی انتخابی است(۸). تحقیقات جدید در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که آرتمیزینین به تنهایی قادر به از بین بردن انتخابی سلول‌های سرطانی است. در حالی که بر سلول‌های طبیعی اثر سویی ندارد(۹).

هری لای و همکاران(۲۰۰۶) پتانسیل آرتمیزینین را در جلوگیری از رشد سرطان سینه در موش مطالعه کردند که با یک دوز خوراکی(mg/kg۵۰) از ۷ و ۱۲ دی متیل بنزن آنترازن که به عنوان القا کننده سرطان سینه است، استفاده شد. در این بررسی یک گروه از موش‌ها که با آرتمیزینین ۰/۰۲ درصد خوراک داده شده با گروه شاهد که با پودر ساده تغذیه شده بودند مقایسه و نشان داده شد که آرتمیزینین باعث کاهش سرطان در مقایسه با شرایط کنترل شد(۱۰).

منابع محدود تهیه و روش‌های پیچیده استخراج آرتیمیزین و مقرون به صرفه نبودن این روش‌ها سبب شده تا در پی یافتن راههایی برای کاهش هزینه و اثر بخشی بهتر این دارو باشیم مطالعه حاضر با هدف نیوزومه کردن

www.SID.ir

Archive of SID

آرتمیزینین، بهینه سازی فرمولاسیون و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی آن است.

مواد و روش‌ها

آرتمیزینین، span20، span60، کلسترول و محلول MTT(0.5 mg/ml) مورد استفاده در این تحقیق از شرکت سیگما آلدریچ، ایزوپروپانول و اتانول از شرکت مرک و محیط کشت RPMI 1640 از شرکت Invitrogen خریداری و رده سلولی MCF-7 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

روش‌ها:

رسم منحنی استاندارد آرتمیزینین:

برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلفی (0.312-0.5 mg/ml) از آرتمیزینین استاندارد تهیه گردید و جذب آنها در طول موج ۱۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس با توجه به غلظت‌های مورد استفاده و جذب متناظر آنها، منحنی استاندارد به کمک نرم افزار اکسل رسم و معادله آن جهت تعیین غلظت‌های مجهول مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه فرمولاسیون نیوزومی آرتمیزینین:

برای تهیه نیوزومهای آرتمیزینین از دو روش تبخیر فاز معکوس و تزریق اتر استفاده شد و از سورفکتانت و کلسترول و دارو در غلظت‌های مختلف استفاده گردید .

تهیه فرمولاسیون نیوزومی به روش تبخیر فاز معکوس:

فرمولاسیون‌های متفاوت نیوزومی با استفاده از این روش که اولین بار توسط Azmine در ساب ۱۹۸۵ توضیح داده شده است تهیه شدند. نسبت‌های مختلفی از سورفکتانت‌های span60، Span20، کلسترول و دارو در اتانول حل و سپس فاز حلال توسط دستگاه روتاری تحت شرایط خلاء و در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد با چرخش ۹۰ دور در دقیقه، جدا گردید. ژلوز باقیمانده به کمک بافر فسفات و درحالی‌که بر روی همزن مغناطیسی (۳۷ درجه سانتیگراد،۳۰۰ دور در دقیقه) قرار داشت، هیدراته گردید. جهت همگن‌سازی اندازه ذرات، سوسپانسیون نیوزومی سونیکه(با توان ۳۵ وات به مدت ۵ دقیقه) گردید و سپس جهت انجام آزمایشات در یخچال قرار گرفت(۱۱).

تهیه فرمولاسیون نیوزومی به روش تزریق اتر:

فرمولاسیون‌های متفاوت نیوزومی با استفاده از این روش که اولین بار توسط Bigham و Deanmer در سال ۱۹۷۶ ارائه شد، تهیه گردید. مانند روش قبل غلظت‌های متفاوتی از سورفکتانت، کلسترول و دارو تهیه شده و در مقدار مناسبی دی اتیل اتر حل شد سپس قطره قطره به داخل محلول بافر فسفات سالین(10mM ،pH 7.4) که بر روی همزن مغناطیسی(۵۰-۶۰ درجه سانتی گراد، ۳۰۰ دور در دقیقه) قرار داشت، تزریق گردید(۱۱، ۱۲ و ۱۳).

تعیین اندازه وزیکول‌های نیوزومی:

بررسی قطر و پتانسیل زتای نیوزوم‌های آرتمیزینین با استفاده از دستگاه زتاسایزر(Zen 3600, Malvern Instrument Ltd, Malvern Worcestershire,UK) تعیین گردید.

درصد کپسوله شدن:

سنجش میزان انکپسوله شدن بطور غیرمستقیم و با استفاده از سانتریفیوژ(۱۷۰۰۰g، ۶۰ دقیقه، ۴ درجه سانتیگراد) انجام شد به این ترتیب که مقدار مشخصی از فرمولاسیون نیوزومی دارو سانتریفیوژ گردید و رسوب بدست آمده نیز دوبار با فسفات بافر سالین شسته شد و مقدار داروی آزاد در مایع فوقانی اندازه‌گیری و سپس با استفاده از معادله زیر بازده انکپسولاسیون محاسبه گردید.

معادله ۱:

$$\text{بازده انکپسولاسیون} = \frac{\text{مقدار داروی محبوس شده}}{\text{مقدار کل دارو}} \times 100$$

مطالعه رها سازی دارو به صورت برون تنی:

مطالعه رهایش دارو از وزیکول‌های نیوزومی با استفاده از روش انتشار دینامیکی از غشا دیالیز انجام شد. به این ترتیب که مقدار معینی از فرمولاسیون نیوزومی دارو در داخل کیسه دیالیزی ریخته و سپس این کیسه دیالیز را داخل ۲۵ میلی لیتر بافر فسفات سالین (10mM،pH7.4) قرار داده و سپس بر روی یک همزن مغناطیسی(۳۷ درجه به مدت ۳۲h با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه) قرار می‌دهیم. در فواصل زمانی مختلف مقدار دو میلی لیتر از بافر اطراف کیسه را برداشته شده و توسط همان مقدار بافر تازه جایگزین می‌کنیم و سپس جذب نوری آرتمیزینین را در نمونه‌ها بدست آمده در طول موج ۱۹۵ نانومتر اندازه‌گیری

www.SID.ir

Archive of SID

کرده و به کمک منحنی استاندارد میزان رهایش دارو در زمان‌های مختلف تعیین می‌گردد.

بررسی سمیت سلولی دارو:

صد میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰۰۰ سلول MCF-7 را در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و تحت شرایط 5% CO_2 انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها را برداشته و غلظت‌های مختلف از فرمولاسیون نانونیوزومه دارو، کنترل آن و داروی استاندارد را بر روی سلول‌ها ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ذکر شده انکوبه شد، سپس محلول رویی را برداشته و محلول MTT (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر) اضافه می‌کنیم و پس از ۳ ساعت انکوباسیون، رنگ ارغوانی(مربوط به تشکیل فورمازان) در سلول‌های زنده در صد میکرولیتر ایزوپروپانول حل شده و جذب آنها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود(اسپکتروفوتومتر مدل Power Eave XS) و میزان IC50 با استفاده از برنامه pharm محاسبه شد.

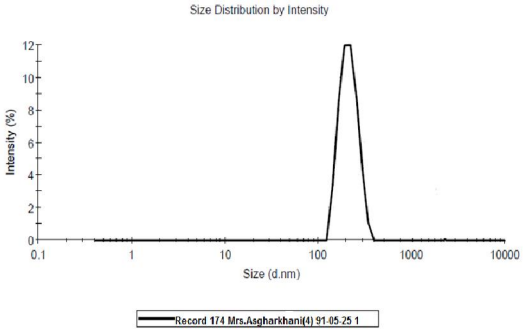
آنالیز آماری

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار(SD, n=3) بیان شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPPS و با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه آنالیز گردید. در $p<0.05$ اختلاف معنی دار اعلام شد.

نتایج

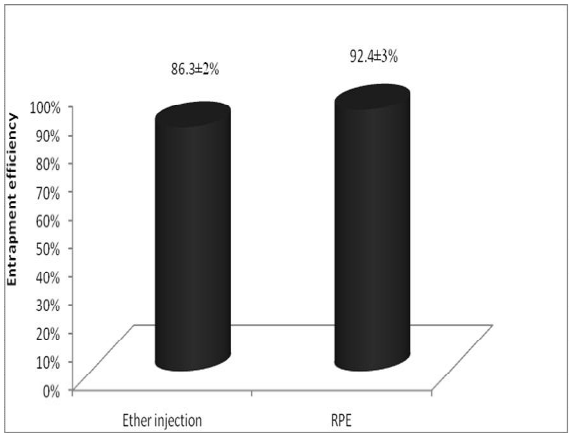
تعیین اندازه نانو ذره:

میانگین قطر نانونیوزوم‌ها با استفاده از دستگاه زتا سایزر برای نمونه آرتیمیزین نانو نیووزومه به روش تزریق اتر ۳±۲۲۰ نانومترو روش تبخیر فاز معکوس ۵±۲۶۷ نانومتر بدست آمد.



درصد انکپسولاسیون:

درصد انکپسولاسیون با توجه به منحنی استاندارد و به کمک معادله ۱، محاسبه گردید. درصد داروی انکپسوله شده برای داروی نیوزومه شده به روش تزریق اتر ۲±۸۶/۳ و برای داروی نیوزومه شده به روش تبخیر فاز معکوس ۳±۹۲/۴ درصد بدست آمد(نمودار ۱).



نمودار ۱: درصد کپسوله شدن برای نمونه‌های آرتمیزینین نیوزومه تهیه شده به روش تزریق اتر برای شکل سمت چپ و روش تبخیر فاز معکوس برای شکل سمت راست

بررسی رهایش دارو:

مقدار آرتمیزینین آزاد شده از فرمولاسیون دارویی تهیه شده در بافر فسفات طی بازه‌های زمانی ۱، ۲، ۳، ۲۴ و ۳۲ ساعت با استفاده از منحنی استاندارد بدست آمد. مقدار داروی آزاد شده در بافر فسفات برای فرمولاسیون آرتمیزینین نانونیوزومه به دو روش تزریق اتر(رنگ آبی) و تبخیر فاز معکوس(رنگ قرمز) در منحنی ۲ نشان داده شده است.

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی دارو:

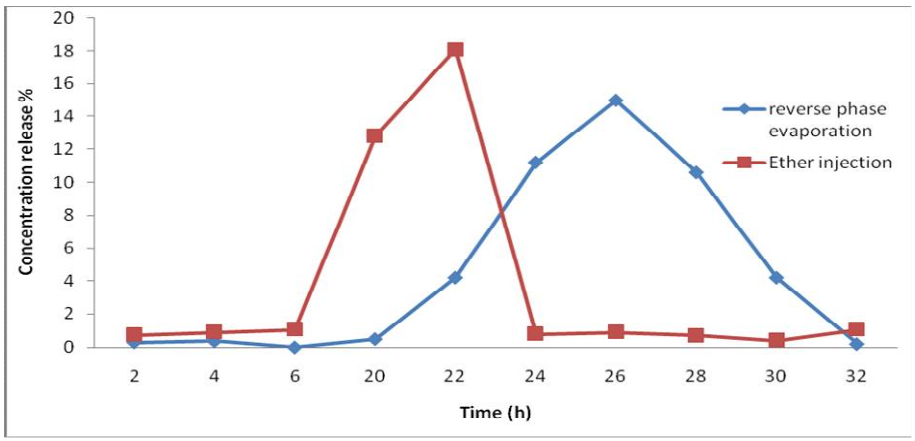
میزان سایتوتوکسیسیتی فرمولاسیون آرتیمیزین نیوزومه شده و آرتمیزینین استاندارد در غلظت‌های مختلف به کمک روش MTT بررسی شد که نتایج در نمودار۲ آورده شده است.

بحث و نتیجه گیری

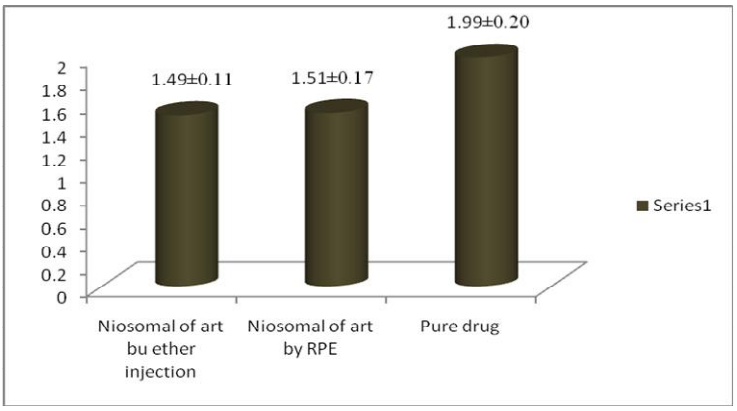
همان‌گونه که می‌دانید روش معمولی درمان دارویی سرطان، بدین صورت است که ماده موثر را وارد بدن می‌کنند و این ماده علاوه بر سلول‌های سرطانی به دیگر سلول‌ها و بافت‌های بدن نیز تاثیر می‌کند. این امر، باعث مصرف بسیار بالای دارو شده و مهم‌تر اینکه موجب آسیب

www.SID.ir

Archive of SID



منحنی۲: منحنی رهایش آرتیمیزین در بافر PBS با استفاده از کیسه دیالیز. منحنی آبی مربوط به روش تبخیر فاز معکوس و منحنی قرمز مربوط به روش تزریق اتر است.



نمودار۲: مقادیر IC50 (برحسب میکروگرم در میلی لیتر) برای فرمولاسیون آرتیمیزین نیوزمه شده به دو روش تبخیر فاز معکوس و تزریق اتر و داروی استاندارد فاقد نیوزوم

رساندن به بافت‌های مجاور بدن نیز می‌شود. از آنجایی که آرتیمیزین یک ماده طبیعی گیاهی است عوارض کمتری نسبت به مواد شیمیایی دارد اما محدودیت‌هایی از جمله پاکسازی سریع توسط ماکروفاژها یا آنزیم‌های لیپاز و متابولیزاسیون سریع توسط کبد و ... که مدت زمان گردش خونی را کاهش می‌دهد. در روش‌های جدید نانو تکنولوژی مانند دارو رسانی از الگویی پیروی می‌شود که سبب تغییر مشخصات دارو می‌گردد. مشخصاتی مثل جذب دارو، زمان رهایی دارو، میزان لازم آن، زمان دفع آن، ایمنی آن و در نهایت سبب افزایش اثر درمانی و ایمنی شده و بیماران نیز در استفاده از این دسته از داروها راحت‌تر و سالم‌تر هستند.

از مقایسه دو روش با توجه به قطر نیوزومها معلوم شد که روش تبخیر فاز معکوس منجر به ایجاد وزیکول‌های چند لایه و روش تزریق اتر وزیکول‌های تک لایه را تشکیل می‌دهد. در تایید این مطلب می‌توان به بالاتر بودن بازده انکپسولاسیون فرمولاسیون نیوزومی به روش تبخیر فاز معکوس نسبت به روش تزریق اتر اشاره کرد(نمودار۱). همچنین در بررسی الگوی آزاد شدن دارو از نیوزومها این پدیده محسوس خواهد بود. در بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی فرمولاسیون‌های تهیه شده مشاهده شد که نیوزومهای فاقد دارو(کنترل) به تنهایی اثری بر رده سلولی MCF-7 نداشتند و تاثیر فرمولاسیون نیوزومه شده بسیار بیشتر از داروی خالص نیوزومه نشده است (IC50 آن کمتر بود). در واقع اثر سایتوتوکسیسیتی آنها تفاوت کاملاً معنی داری با یکدیگر نشان می‌دهد. تمام این نتایج متاثر از نقش حامل‌های دارو رسانی(نیوزوم) در انتقال بهتر دارو و بهبود عملکرد آن است. همان طور که انتظار می‌رفت فرمولاسیون نیوزومی آرتیمیزینین باعث افزایش شاخص درمانی و کاهش دوز مصرفی آن می‌شود. با کاهش دوز مصرفی دارو، هزینه درمانی کاهش می‌یابد و

www.SID.ir

Archive of SID

عوارض جانبی از جمله اثر سمیتی آن کاهش یافته است (نمودار۲).

در مطالعه رهایش دارو مشاهده می‌شود که الگوی آزاد شدن دارو از فرمولاسیون نیوزومه کندتر صورت گرفته و این نتیجه حاکی از پایداری بالای فرمولاسیون نیوزومه نسبت به داروی خالص است. از میان دو روش تهیه نیوزومها رهایش دارو از نیوزمهای تهیه شده به طریق تبخیر فاز معکوس آهسته‌تر از روش تزریق اتر است که این به دلیل تشکیل وزیکول‌های تک لایه به دلیل تبخیر سریع‌تر حلال در روش تزریق اتر نسبت به روش تبخیر فاز معکوس که وزیکول‌های چند لایه ایجاد شده است. دارو مسافت بیشتری را طی می‌کند و به آهستگی رهایش پیدا کرده مدت زمان گردش خونی آن افزایش می‌یابد.

References

1. Zawang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. Annual Review of Medicine 2012; 63:185-98.

2. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I. Breast Cancer in Iran: An Epidemiological Review. The Breast J 2007; 13(4): 383-91.

3. Paolino D, Muzzalupo R, Ricciardi A, Celia C, Picci N, Fresta M. Biomed. Microdevices 2007; 9: 421-33.

4. Singh NP, Lai H. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. Anticancer Res 2004; 24: 2277-80.

5. Cabello CM, Lamore SD, Bair WB 3rd, Qiao S, Azimiran S, Lesson JL, Wondrak GT (2011). The redox antimalarial dihydroartemisinin targets human metastatic melanoma cells but not primary melanocytes with induction of NOXA-dependent apoptosis. Invest. New Drugs. doi:10.1007/s10637-011-9676-7. PMID 21547369. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21547369.

6. Gong Y, Gallis BM, Goodlett DR, Yang Y, Lu H, Lacoste E, Lai H, Sasaki T. Effects of transferrin conjugates of artemisinin and artemisinin dimer on breast cancer cell lines, Pub med 2013.

7. Brunner CS. Product Genesis Report, Challenges and Opportunities in Emerging Drug Delivery Technologies. United States, product genesis journal 2004; 1-5.

8. Peng CA, Ferreira JFS, Wood AJ. Direct analysis of Artemisinin from Artemisia annua L. using highperformance liquid chromatography with evaporative light scattering detector, and gas chromatography with flame ionization detector. J Chromatogr A 2006;1133: 254-8.

9. Lai H, Sasaki T, Singh NP. Targeted treatment of cancer with artemisinin and artemisinin-tagged iron-carrying compounds 2005.

10. Navaratnam V, Mansor SM, Sit NW, Grace J, Li Q, Olliaro P. Pharmacokinetics of artemisinintype compounds. Clin Pharmacokinet 2000; 39: 255-70.

11. Vyas SP, Khar RK. Targeted and Control Drug Delivery. CBS Publishers and Distributors, New Delhi 2002; 1(6): 249-76.

12. Baillie AJ, Florence AT, Hume LR, Muirhead GT, Rogerson AJ. Pharm. Pharmacol 1985; 37: 863-8.

13. Rogerson A, Cummings J, Willmott N, Florence ATJ. Pharm. Pharmacol 1988; 40: 337-42.

www.SID.ir