

# بررسی اثر لیپوپلی ساکارید بر میزان نیتریک اکساید و گلوکز سرم خون موش صحرایی

## نژاد Sprague Dawley

### چکیده

زمینه و هدف: نیتریک اکساید یکی از ده مولکول کوچک لیپوفیلی است که توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (Nitric oxide synthase=NOS) از اسید آمینه L-Arginine،  $O_2$  و Reduced form of Nicotinamide (NADPH) دارای فعالیت‌های گسترده بیولوژیکی در سیستم‌های مختلف می‌باشد، به عنوان مثال در سیستم ایمنی، هم نقش محافظتی و هم نقش سیتوتوکسیک دارد و در سیستم قلبی - عروقی به عنوان یک میانجی فیزیولوژیک و کنترل تونیسیت عروق نقش مهمی دارد. یکی از ایزوفرم‌های آنزیم NOS بنام iNOS (Inducible NOS) توسط محرک‌های مختلفی از جمله لیپوپلی ساکارید (Lipopolysaccharides=LPS) که بخشی از غشای باکتری‌های گرم منفی است، تحریک شده که در نهایت منجر به تولید NO در مدت زمان طولانی می‌شود. از آنجایی که هر دو مولکول گلوکز و نیتریک اکساید در سیستم بیولوژیک دارای اهمیت هستند، در مطالعه حاضر سعی شد تا اثر لیپوپلی ساکارید بر میزان تولید NO و گلوکز در سرم خون موش صحرایی (رت) نژاد SD (Sprague Dawley) بررسی شود.

روش بررسی: در این مطالعه تعداد ۵۰ عدد رت نژاد SD دارای وزن متوسط ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم انتخاب شدند. رت‌ها در پنج گروه ده‌تایی تقسیم شدند؛ گروه‌های یک تا ۳ به ترتیب ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن لیپوپلی ساکارید از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و گروه چهارم ۰/۸ میلی‌لیتر سالین به ازای هر کیلوگرم از وزن به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند و به گروه پنجم هیچ ماده‌ای تزریق نشد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تزریق، نمونه‌های خونی، جمع‌آوری و سرم‌ها جدا شدند و سپس مقدار نیتریک اکساید، به روش گریس (Griess) و مقدار گلوکز، به روش کالیمتری اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت LPS، مقدار نیتریک اکساید تولید شده در گروه‌های ۱، ۲ و ۳ نسبت به گروه‌های کنترل، افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته که بیش‌ترین مقدار آن مربوط به گروه ۳ بوده است ( $P < 0.05$ ) و همچنین غلظت گلوکز نیز همگام با افزایش تزریق LPS در گروه‌های ۱، ۲ و ۳، افزایش نشان داد؛ بطوری که در گروه ۳ افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گروه کنترل داشت ( $P < 0.05$ ).

نتیجه‌گیری: بنابراین به نظر می‌رسد که LPS موجب تحریک ایزو آنزیم iNOS و تولید NO شده، که افزایش نیتریک اکساید وابسته به دوز LPS بوده و افزایش NO، متعاقباً موجب افزایش گلوکز گردیده است.

کلیدواژه‌ها: ۱- لیپوپلی ساکارید ۲- نیتریک اکساید ۳- گلوکز

تاریخ دریافت: ۸۴/۶/۱، تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۲/۲۲

### مقدمه

اکسیژن در حدود ۴ ثانیه می‌باشد. NO با آب و اکسیژن ترکیب شده و مطابق معادلات زیر در نهایت به نیتريت و نیترات تبدیل می‌شود. (۲ و ۳)

نیتریک اکساید از یک اتم نیتروژن و یک اتم اکسیژن تشکیل شده است. (۱) نیتریک اکساید دارای نیمه عمر کمتری می‌باشد و نیمه عمر آن در محیط بیولوژیکی و در حضور

(I) استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، تقاطع بزرگراه همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران (\*مؤلف مسؤول).

(II) دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

(III) دانشیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

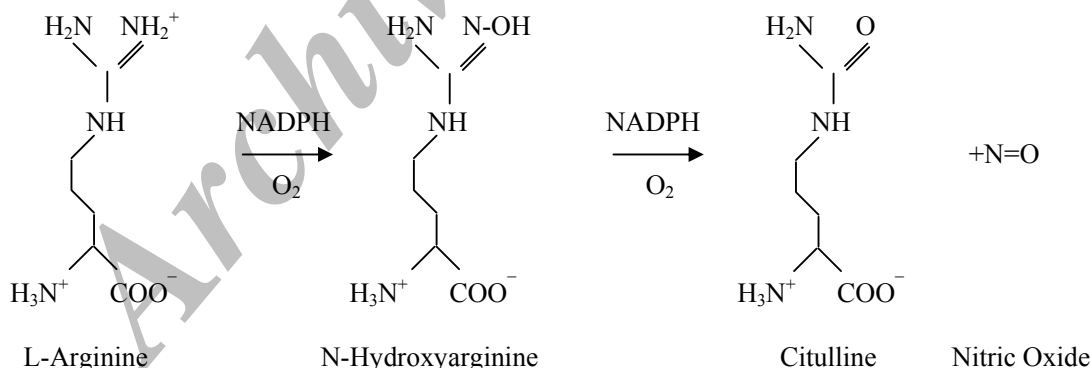
(IV) استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

LPS (لیپوپلی ساکارید) در غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی مثل *Neisseria*, *Haemophilus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* و ... وجود دارد و از دو قسمت عمده لیپیدی و پلی ساکاریدی تشکیل شده است و نام دیگرش اندوتوکسین باکتریایی می‌باشد. ایمونوژن بودن LPS هم به علت بخش پلی ساکاریدی آن می‌باشد.<sup>(۸)</sup>

در این طرح اثرات لیپوپلی ساکارید (LPS) بر تولید نیتریک اکساید و گلوکز در موشهای صحرایی نژاد SD مورد بررسی قرار گرفت.

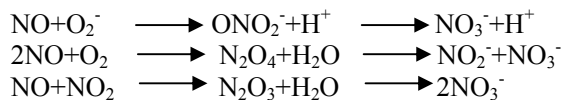
در سال ۱۹۹۷، Bedard S و همکارانش پی بردند که تولید نیتریک اکساید در مجاورت سیتوکین‌های فاکتور نکروز تومور آلفا، اینترفرون گاما و لیپوپلی ساکارید افزایش می‌یابد. از طریق (Real time-polymerase chain) RT-PCR (Reaction) معلوم شد که منبع تولید نیتریک اکساید، سلولهای ماکروفاژ می‌باشد و بیان ژن iNOS در آنها زیاد می‌شود و در نهایت پی بردند که سیتوکین‌ها و لیپوپلی ساکاریدها با افزایش تولید نیتریک اکساید باعث افزایش انتقال گلوکز در میوسیت‌های L6 می‌گردند.<sup>(۹)</sup>

در این طرح سعی شد تا با تزریق غلظت‌های مختلف لیپوپلی ساکارید به موشهای صحرایی نژاد SD، تغییرات



نیتریک اکساید و گلوکز سرم بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تزریق بررسی شوند.

Dwairi QEL و همکارانش (۱۹۹۸) و Zhang C و Ranina و همکارانشان (۲۰۰۰) پی بردند که لیپو پلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی موجب تولید سیتوکین‌ها و نیتریک اکساید می‌شود.<sup>(۱۰-۱۲)</sup>



تحت شرایط طبیعی بدن، مقدار کمی NO که توسط نیتریک اکساید سنتاز نوع I و III سنتز می‌شود، در بسیاری از اعمال فیزیولوژیک بدن شرکت می‌کند. در شرایط پاتولوژیکی، مقدار زیادی از NO توسط نیتریک اکساید سنتاز نوع II تولید شده و در سیستم دفاعی بدن شرکت می‌کند.<sup>(۵ و ۶)</sup>

آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) یک آنزیم همودایمر بوده و علی‌رغم سادگی ملکول نیتریک اکساید، دارای ساختمان پیچیده‌ای است. آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) دارای سه ایزوفرم می‌باشد، Neuronal Nitric Oxide (nNOS)، Inducible Nitric Oxide (iNOS) یا NOSI (Synthase Endothelial Nitric Oxide) و NOSII (Synthase Endothelial Nitric Oxide) یا NOSIII (Synthase).

آنزیم نیتریک اکساید سنتاز مطابق واکنش زیر با استفاده از اسید آمینه L-Arginine،  $\text{O}_2$  و NADPH واکنش انجام داده و در نهایت مولکول نیتریک اکساید و Citrulline را طی چند مرحله سنتز می‌کند.<sup>(۷ و ۶)</sup>

NO دامنه فعالیت گسترده‌ای در بدن دارد که از حوزه‌های فعالیت نیتریک اکساید در بدن می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

سیستم قلبی و عروقی، سیستم ادراری - تناسلی، مجرای معدی - روده‌ای، سیستم عصبی مرکزی، سیستم تنفسی، سیستم غددی، سیستم ایمنی و ...

## روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی (Experimental) بود و از مدل حیوانی Rat استفاده شد.

تعداد ۵۰ عدد موش صحرایی نژاد SD (Sprague Dawley) از جنس نر که دارای وزنه‌های ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم بودند، برای این مطالعه انتخاب شدند و در پنج گروه ده‌تایی گروه‌بندی شدند. به گروه‌های اول تا سوم، LPS تزریق شد که LPS مورد استفاده در این مطالعه از نوع E Lipopolysaccharide. ALEXIS USA Coli-Serotype 055:85 بود و برای آماده‌سازی آن ۲۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به آن اضافه و سپس به گروه‌های مورد نظر تزریق شد.

برای اندازه‌گیری نیتریک اکساید از کیت Cod: MDI 040 Colorimetric Nitric Oxide Assay Kit استفاده شد که بر مبنای روش گریس و براساس طیف سنجی می‌باشد.

برای اندازه‌گیری گلوکز از کیت گلوکز پارس آزمون استفاده شد و اساس اندازه‌گیری بر مبنای طیف سنجی می‌باشد. ماده تزریق شده به گروه‌های مورد مطالعه به شرح زیر بود:

۱) گروه اول: ۰/۲ میلی‌گرم از LPS به ازای هر کیلوگرم وزن به صورت داخل صفاقی (Intraperitoneal=IP) تزریق شد.

۲) گروه دوم: ۰/۴ میلی‌گرم از LPS به ازای هر کیلوگرم وزن از LPS به صورت داخل صفاقی (IP) تزریق شد.

۳) گروه سوم: ۰/۸ میلی‌گرم از LPS به ازای هر کیلوگرم وزن به صورت داخل صفاقی (IP) تزریق شد.

۴) گروه چهارم: در این گروه به جای LPS، به هر کدام از رت‌ها ۰/۸ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به ازای هر کیلوگرم از وزن به صورت داخل صفاقی (IP) تزریق شد.

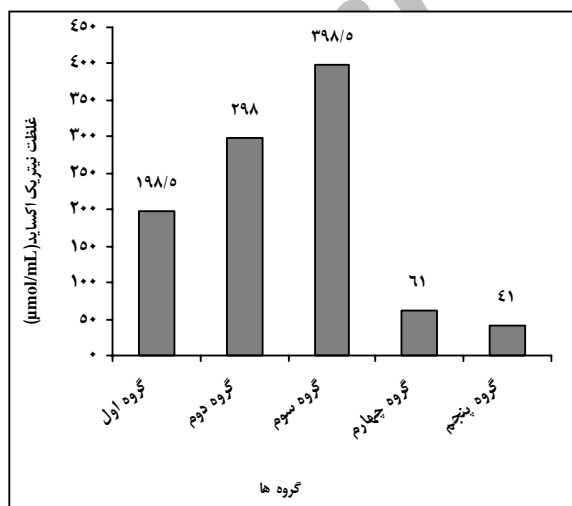
۵) گروه پنجم: در این گروه هیچ گونه تزریقی انجام نشد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تزریق LPS به گروه‌های مورد مطالعه، از آنها خونگیری شد و سپس سرم آنها جدا شد. در نمونه‌های بدست آمده، پارامترهای نیتریک اکساید (NO) با روش گریس (Griess) و گلوکز با روش کالریمتری اندازه‌گیری شد.

برای تجزیه و تحلیل آماری از برنامه نرم‌افزاری Statistical package for social science (SPSS) (Version 11.5) استفاده شد و با روش Post. One Way ANOVA. Scheffe و Hoc مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین گروه‌ها با Pvalue کمتر از ۰/۰۵ به عنوان ارتباط معنی‌دار نتایج حاصله، در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

در این مطالعه بعد از اندازه‌گیری پارامترهای نیتریک اکساید (NO) و گلوکز در نمونه‌های تهیه شده، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت تزریق لیپوپلی ساکارید، میزان نیتریک اکساید افزایش یافت و این افزایش معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) و همگام با افزایش نیتریک اکساید، گلوکز سرم نیز افزایش یافت ( $P < 0.05$ ).

همانطور که در نمودار شماره ۱ ملاحظه می‌شود، بیش‌ترین مقدار نیتریک اکساید در گروه سوم می‌باشد، که بیش‌ترین مقدار لیپوپلی ساکارید را دریافت کرده بودند (۰/۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن) و کمترین مقدار نیتریک اکساید در گروه پنجم می‌باشد که هیچ گونه تزریقی نداشتند. بین تزریق LPS و افزایش NO ارتباط معنی‌داری وجود داشت ( $P \text{Value} < 0.05$ ).



نمودار شماره ۱ - مقایسه غلظت نیتریک اکساید در گروه‌های مورد مطالعه

در مطالعه حاضر برای تولید NO از محرک LPS در دوزهای مختلف استفاده شد و نیتریک اکساید اندازه‌گیری شده در گروه‌های مورد مطالعه، نشان دهنده این مطلب بود که تزریق LPS باعث افزایش NO شده و در گروه‌هایی که مقدار بیش‌تری LPS دریافت کرده بودند، افزایش غلظت نیتریک اکساید بیش‌تر بود.

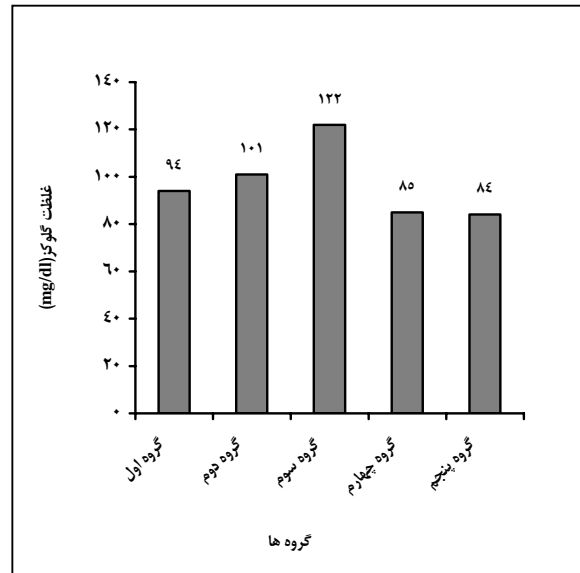
با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، با افزایش مقدار تزریق لیپوپلی ساکارید در گروه‌های اول (۰/۲ میلی‌گرم LPS به ازای هر کیلوگرم وزن)، دوم (۰/۴ میلی‌گرم LPS به ازای هر کیلوگرم وزن) و سوم (۰/۸ میلی‌گرم LPS به ازای هر کیلوگرم وزن)، مقدار غلظت نیتریک اکساید افزایش یافت و این افزایش با تزریق بیش‌تر لیپوپلی ساکارید همگام بود؛ بطوری که مقدار افزایش در گروه سوم بیش‌تر از گروه دوم و در گروه دوم بیش‌تر از گروه اول بود. این نتایج با نتایج Zhang C و همکاران، Ranina N و همکاران و Dwairi QEL که در فاصله سالهای ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۰ انجام شد، مطابقت دارد.<sup>(۱۰-۱۲)</sup>

در این مطالعه با افزایش دوز تزریق لیپوپلی ساکارید، غلظت نیتریک اکساید افزایش یافت. همگام با افزایش نیتریک اکساید، غلظت گلوکز در گروه‌های مورد مطالعه افزایش پیدا کرده بود.

از جمله مطالعاتی که قبل از مطالعه حاضر پیرامون اثر نیتریک اکساید بر متابولیسم گلوکز انجام شده است، می‌توان به مطالعات زیر اشاره نمود:

در سال ۲۰۰۱، HS Moeniralam و همکارانش به بررسی اثر نیتریک اکساید بر تنظیم متابولیسم گلوکز در پاسخ به تزریق LPS در سگ پرداختند که این دانشمندان در نهایت متوجه شدند که NO به عنوان تنظیم کننده مهم گلوکز در سگها نمی‌باشد<sup>(۱۵)</sup>، ولی در مطالعه اخیر افزایش NO موجب افزایش غلظت گلوکز در رتها شده بود.

در سال ۲۰۰۲، Hioroki Sugita و همکارانش متوجه شدند که با تزریق LPS میزان خروجی گلوکز از کبد بیش‌تر می‌شود و با تزریق LPS به همراه یکی از مهارکنندگان iNOS (آمینوگوانیدین)، میزان گلوکز خروجی از کبد کمتر



نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین غلظت گلوکز در گروه‌های مورد مطالعه

همانطور که در نمودار شماره ۲ ملاحظه می‌شود بیش‌ترین مقدار افزایش غلظت گلوکز مربوط به گروه سوم می‌باشد که بیش‌ترین مقدار LPS را دریافت نموده‌اند (۰/۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن) و کمترین غلظت گلوکز مربوط به گروه چهارم و پنجم می‌باشد که LPS دریافت نکرده‌اند. بین تزریق LPS و افزایش غلظت گلوکز ارتباط معنی‌دار وجود داشت ( $PValue < 0.05$ ).

#### بحث

مطالعات نشان داده است که سلولهای میکروبی، محرکهای پر قدرتی برای تولید نیتریک اکساید به شمار می‌آیند<sup>(۱۳)</sup> و نیز تحقیقات بعدی نشان داده‌اند که لیپوپلی ساکارید (LPS) موجود در غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی باعث تحریک سلولهای ایمنی از جمله ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها می‌شود و غلظت NO را افزایش می‌دهد.<sup>(۱۴)</sup> محرکهایی که باعث افزایش بیان آنزیم NOS II می‌شوند عبارتند از:

- Lipopolysacchride (LPS)
- TNF- $\alpha$  (Tumour necrosis factor- $\alpha$ )
- IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ )
- IL1 $\beta$

8- Gunneth CA, Chu Y, Heistad DD, Loihl A, Faraci FM. Vascular effects of LPS in mice deficient in expression of the gene for inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1998; 275: H416-H421.

9- Bedard S, Marcotte B, Marette A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 1997 Jul; 15[325(Pt 2)]: 487-93.

10- Zhang C, Walker LM, Mayeux PR. Role of nitric oxide in lipopolysacchride induced oxidant stress in the rat kidney. *Biochemistry Pharmacology* 2000; 59: 203-9.

11- Raina N, Matsui J, Jeejeebhoy KN. Nutritional and metabolic effects of the endotoxin bacterial LPS in orally and parenterally fed rats. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 71(3): 835-43.

12- Dwairi QEL, Comtois A, Guo Y, SNA Hussain. Endotoxin induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthase. *American Journal of physiology* 1998; 274(Cell Physiology 43): 770-9.

13- Lamas S, Marsden PN, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6348-52.

14- Burgrin JP, Shabani M, Chakrvarthy S, Smith DJ. Nitric oxide synthesis is suppressed in steroid-impaired and diabetic wounds. *Wounds* 1995; 7(2): 48-57.

15- HS Moeniralam, F Sprangers, E Endert, MT Ackermans, JJB Van Lanschot, HP Sauerwein, et al. Role of nitric oxide in the regulation of glucose kinetics in response to endotoxin in dogs. *J Appl Physiol* 2001; 91: 130-6.

16- Hiroki Sugita, Masao Kaneki, Eriko Tokunaga, Michiko Sugita, Chieko Koike, Shingo Yasuhara, et al. Inducible nitric oxide synthase plays a role in LPS-induced hyperglycemia and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282: E386-E394.

17- Won JS, Im YB, Key L, Singh I, Singh AK. The involvement of glucose metabolism in the regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in glial cells: possible role of glucose-6-phosphate dehydrogenase and CCAAT/enhancing binding protein. *J Neurosci* 2003 Aug; 23(20): 7470-8.

می‌شود و بیان mRNA دو آنزیم PEPCK و فسفریلاز کبدی که به ترتیب در مسیرهای گلوکونئوژنز و گلیکوژنولیز نقش اساسی دارند، کمتر می‌شود.<sup>(۱۶)</sup>

در سال ۲۰۰۳، Won JS و همکارانش پی بردند که در سلولهای عصبی رتها با افزایش غلظت گلوکز، میزان بیان ژن iNOS افزایش می‌یابد و در این مطالعه به بررسی ارتباط متابولیسم گلوکز با تنظیم ژن iNOS پرداخته شد و نتیجه‌گیری شد که با افزایش غلظت گلوکز خارج سلولی در سلولهای عصبی رتها، میزان بیان ژن iNOS افزایش می‌یابد.<sup>(۱۷)</sup>

### نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که با افزایش تزریق لیپوپلی ساکارید، غلظت نیتریک اکساید افزایش می‌یابد و در نهایت افزایش غلظت نیتریک اکساید موجب افزایش غلظت گلوکز می‌گردد؛ بنابراین به نظر می‌رسد محرکها از جمله لیپوپلی ساکارید (LPS) باکتری‌های گرم منفی از طریق افزایش فعالیت iNOS باعث اختلال در برداشت (Up take) و یا متابولیسم گلوکز می‌شوند.

### فهرست منابع

- 1- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* 1994; 298: 249-58.
- 2- Porsti I, Poakkari I. Nitric oxide based possibilities for pharmacotherapy. *Annals of medicine* 1995; 27: 407-20.
- 3- Synder SH, Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American* 1992 May; 266(5): 68-77.
- 4- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-64.
- 5- Balon TW. Role of nitric oxide in contraction induced glucose transport. *Adv Exp Med Biol* 1998; 441: 87-95.
- 6- Barberger MD, Olson LP, Houk KN. Mechanisms of peroxynitrite oxidations and rearrangements, The Theoretical perspective. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 710-11.
- 7- Liu X, Miller MJS, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JR. Accelerated reaction of nitric oxide with O<sub>2</sub> within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2175-9.

## *The Effect of Lipopolysaccharide(LPS) on Nitric Oxide(NO) and Glucose Concentration in the Serum of SD Rats(Sprague Dawley)*

<sup>I</sup>  
\*M. Shabani, Ph.D.      <sup>II</sup>  
B. Afarideh, MSc      <sup>III</sup>  
M. Firoozrai, Ph.D.  
<sup>IV</sup>  
H.R. Pazooki, Ph.D.

### *Abstract*

**Background & Aim:** Nitric Oxide(NO) is one of the ten smallest lipophilic molecules synthesized from L-Arginine, O<sub>2</sub> and NADPH by nitric oxide synthase enzyme(NOS). NO has various biological activities in different systems. For instance, it plays both protective and cytotoxic roles in immune system, while in cardiovascular system it has physiologic role which controls vascular tonicity. One of the NOS isoforms known as iNOS(inducible NOS) can be induced by variety of some gram negative bacteria membrane that leads to NO production for long period of time. Due to important biological roles of glucose and NO, the present study was designed to investigate the effect of LPS on the level of glucose and NO in serum of SD rats.

**Materials & Methods:** In this study 50 SD male rats with the average weight of 250-300 gram were chosen. Rats were divided into five groups(10 rats in each group). First group received 0.2mg/kg, second group 0.4mg/kg, third group 0.8 mg/kg LPS, fourth group 0.8ml/kg salin via IP injection and the fifth group did not receive any compound. After blood collection and separation of serum, NO level was measured by Griess reagents and glucose by colorimetric method.

**Results:** The obtained results showed that with increased LPS injection, the level of NO increased in group 1, 2 and 3 respectively. The latter group had the maximum level of NO as compared to control group(P<0.05). Glucose concentration increased significantly in third group(P<0.05).

**Conclusion:** It is concluded that increased level of NO production was due to induction of iNOS enzyme by LPS and was dose dependent, and increased level of NO led to increased level of glucose concentration.

**Key Words:** 1) LPS(Lipopolysaccharide)    2) NO(Nitric Oxide)    3) Glucose

<sup>I</sup>) Assistant Professor of Biochemistry Department. School of Basic Sciences. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (\*Corresponding Author)

<sup>II</sup>) MSc Student of Biochemistry. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

<sup>III</sup>) Associate Professor of Biochemistry Department. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

<sup>IV</sup>) Assistant Professor of Physiology Department. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.