Archive of SID

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۹ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۶ صفحات ۵۸- ۵۱

اثرات آنتی هیپرگلیسمیک مهار فسفودی استرازهای نوکلئوتید حلقوی (PDEs) در موش صحرایی

دکتر ناصرپورعلی بهزاد: دکترای علوم آزمایشگاهی، مرکز آموزشی درمانی اسدآبادی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail: npabeh@Yahoo.com
دکتر رضا شفیعی نیک: استادیار فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
دکتر سید محمدرضا پریزاده: استادیار بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

دریافت: ۸۵/۵/۱۴ **پذیرش**: ۸۵/۹/۲۲

چکیده

زمینه و اهداف: افزایش غلظت آدنوزین منوفسفات حلقوی (Cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP) در سلولهای بتا سبب تحریک ترشح انسولین گردیده وآنزیمهای فسفودی استراز (Phosphodiesterases, PDEs) نوکلئوتید حلقوی تنها عامل تجزیه کنندهcAMP بشمار میروند. ایزوآنزیمهای مختلفی از PDE در پانکراس وکبد بیان میشوند که مهمترین آنها PDE3 میباشد. هدف این مطالعه بررسی اثر ترکیبات مهار کننده PDE در حضور گلوکز (بعنوان مهمترین محرک فیزیولوژیک) بر ترشح انسولین و متابولیسم در حیوان بیهوش و شرایط آزمایشگاهی بوده است.

روش بررسی: اثرمهارکننده های PDE نظیر IBMX (غیرانتخابی)، میلرینون، آمرینون و ترکوئینزین (انتخابی PDE3) و دی پیریدامول (انتخابیPDE5) بر ترشح انسولین از جزایر جدا شده رت و مقدار گلوکز و انسولین خون و گلیکوژن کبدی رت بیهوش (با تزریق گلوکز هیپرتونیک بمدت ۹۰ دقیقه) بررسی و اندازه گیری شد.

یافته ها: ترکوئینزین، میلرینون و آمرینون برخلاف دیپیریدامول، سبب تحریک ترشح انسولین از جزایر جدا شده گردیدند. تزریق تمام ترکیبات در رت بیهوش سبب کاهش گلوکز خون به نسبتهای متفاوت گردید. دیپیریدامول و IBMX اثری بر انسولین خون نداشتند. میلرینون و ترکوئینزین موجب افزایش و آمرینون سبب کاهش انسولین شدند. گلیکوژن کبدی رتها با آمرینون، ترکوئینزین وIBMX کاهش و با دیپیریدامول افزایش داشت.

نتیجه گیری: در جزایر جدا شده رت، مهارکننده های PDE3 بر خلاف PDE5 سبب تحریک ترشح انسولین شدند. در رت هیپرگلیسمیک نیز برخی اثرات کاملا متفاوت از مهارکننده های PDE دیده شد. نتیجه آنکه ترکیبات مذکور با بروز اثرات متفاوت، علاوه بر مهار PDE از طریق مکانیسمهای دیگری نیز اعمال اثر میکنند.

کلید واژه ها: فسفودی استراز نوکلئوتید حلقوی، انسولین، میلرینون، آمرینون، ترکوئینزین

مقدمه

نوکلئوتیدهای حلقوی بسیاری از روندهای عمده سلولی نظیر رشد، تمایز، تقسیم و متابولیسم سلولی، اثر هورمونها و حافظه را تنظیم میکنند(۵-۱). گرچه افزایش غلظت کلسیم درون سلولی سیگنال اصلی در اگزوسیتوز بشمار میرود، سایر سیگنالهای داخل سلولی مانند آدنوزین منوفسفات حلقوی نیز در روند ترشح دارای اهمیت ویژه میباشند. افزایش غلظت درون سلولی cAMP از جمله موجب رهایی ناقلین عصبی و هورمونها از بافتهای محیطی نظیر سیناپسهای سمپاتیک و پاراسمپاتیک، انسولین از سلولهای بتا در پانکراس، هورمونهای هیپوفیزی، آمیلاز از سلولهای پاروتید و پانکراس میگردد(۶و۷). مقدار داخل سلولی cAMP برآیندی از تولید آن بوسیله فعال شدن آدنیلات سایکلاز و هیدرولیز توسط فسفودی استرازها است (۱۰-۸). انتشار فسفودی استرازنوکلئوتید PDEs تاحد زیادی وابسته به بافت(۲و۶و۱۴-۱۱) وحتی محدود به نواحی خاصی از سلول است (۳و۷و۱۵و۱۳و۱۶). درسلولهای بتا مهار PDEs با افزایش cAMP وسپس افزایش جریان کلسیم داخل سلولی سبب تحریک ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس در پانکراس میشود(۱۷). از بین ۱۱ خانواده شناخته شده برای PDE

www.SID.ir

Archive of SID

(۳و۱۸و۱۹) ایزوآنزیمهای PDE3 بیش از بقیه برای تحریک ترشح انسولین مورد مطالعه قرارگرفته اند. مهارکننده های PDE3 با تمایل بیشتر نسبت به cAMP دارای اثرات افزاینده انسولین میباشند (۲۰و۲۱). در متابولیسم کبدی، انسولین با مهار گلیکوژن ستتاز کیناز-۳ بوسیله پروتئین کینازها سبب فعال شدن گلیکوژن ستتاز و مهار فسفریلاز، تولید و ذخیره گلیکوژن را تحریک میکند(۱۷و ۲۲-۲۵). در هپاتوسیتها و سلولهای بتای پانکراس برداشت گلوکز بروش انتشار تسهیل شده، توسط پروتئینهای انتقال دهنده گلوکز در غشاء سلولی انجام میگیرد (۲۶). افزایش غلظت cAMP در سلولهای بتا از یک سو موجب تحریک ترشح انسولین میشود، از سوی دیگر انسولین با تحریک فعالیت PDE درسلولهای هدف غلظت cAMP را کاهش میدهد(۲۷و ۲۸). کبد و عضلات اسکلتی محل عمده هوموستاز گلوکز هستند و اولین ضایعه قابل شناسایی در مقاومت نسبت به انسولین شامل نارسایی در انتقال گلوکز، فسفریلاسیون و ذخیره آن بصورت گلیکوژن می باشد(۲۲و۲۹). تحقیقات اخیر با معرفی مهارکننده های انتخابی برای ایزوآنزیمهای PDE بعنوان اهداف دارویی نویدبخش امیدهای بسیار بوده است (۲و۳و ۱۸و۳۰-۳۲). برای پی بردن به اثرات کلی مهارکننده های PDE در بدن بر ترشح انسولین، گلوکز پلاسما و ذخیره گلیکوژن کبدی از میلرینون، آمرینون و ترکوئینزین بعنوان مهارکننده های انتخابیPDE3 (۳۳)، دی پیریدامول بعنوان مهارکننده انتخابی PDE5 (٤) و IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine) بعنوان مهارکننده غیرانتخابی(۳٤و۳۵) ایزوآنزیمهای PDE بصورت تزریق وریدی همزمان با گلوکز هیپرتونیک و ترشح انسولین از جزایر جدا شده رت استفاده گردید.

مواد و روش ها

جزایر لانگرهانس- موشهای صحرایی نر به وزن ۲۵۰ تا ۳٤۰ گرم با رژیم غذایی معمولی انتخاب و هر بار ۲ سر موش بوسیله تیوپنتال به غلظت mg/kg ۸۰ با تزریق داخل صفاقی بیهوش و پانکراس با استفاده از روش تغییر یافته Lacey و Kostianovsky (۲۰) جدا گردید. جزایر لانگرهانس با خرد کردن پانکراس درون ظروف سیلیکونیزه و افزودن کلاژناز هضم و جدا شد. بعد از شستشو توسط کربس سرد(۲۰) جزایر مناسب و سالم جدا و بمحلول کربس منتقل شد. سپس جزایر در دسته های ۵ تایی درون ویالهای شیشه ای حاوی کربس منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و حضور مخلوط اکسیژن ۹۵٪ و گازکربنیک ۵٪ انکوبه شد. سپس محلول رویی با کربس حاوی گلوکز ۳، ۱۰ یا ۲۰ میلی مولار همراه یا بدون دارو تعویض گردید. ۵۰ میکرو لیتر از محلول رویی با ۲۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات مخلوط وتا زمان اندازه گیری انسولین منجمد گردید.

رتهای هیپرگلیسمیک - رتهای نر بالغ از نژاد ان ماری بوزن ۲۲۰ تا ٤۰۰ گرم انتخاب و از حدود ۱۲ ساعت قبل ناشتا نگهداشته شدند. رتها بروش فوق بیهوش شده و بمنظور حفظ یکسانی شرایط در تمام نمونه ها و ممانعت از تغییر غلظت گازها و PH خون ، لوله تنفسی در نای قرار داده شد و تنفس بتعداد ١٤ تا ١٦ بار در دقیقه برقرار گردید. بدنبال آن کاتتر مناسب در شریان و ورید پا آغشته به هپارین (۵۰۰ واحد در میلی لیتر) قرارداده شد. سپس خون ناشتا از شریان گرفته شد و دوز بارگیری هپارین (۱۰۰۰ واحد بر کیلوگرم وزن) تزریق گردید. از کاتتر وریدی دوز بارگیری گلوکز ۰/۵gr/kg انفوزیون شده و بلافاصله دارو با غلظت معین در ۰/۳ تا ۰/۵ میلی لیتر (سرم فیزیولوژیک و حلال) حل و تزریق گردید و بلافاصله پمپ انفوزیون گلوکز ۱/۵gr/kg/hr همراه با هپارین (۱۰۰ واحد بر کیلوگرم) بکار انداخته شد. هنگام رسیدن محلول به رگ ، زمان صفر منظور و بفاصله ۵، ۱۰ ، ۱۵، ۳۰ ، ٤۵ ، ٦۰ ، ۷۵ و ۹۰ دقیقه نمونه خون گرفته شد. پلاسمای خون جدا و برای اندازه گیری گلوکز و انسولین در ^{oC}۲۰- نگهداری گردید. در پایان کبد موش جدا و بعد از توزین برای اندازه گیری مقدار گلیکوژن (بروش هیدرولیز اسیدی) در ^{oC}۲۰- نگهداری شد. برای اندازه گیری گلیکوژن قسمتی از هر کبد (حدود ۰/۵ تا ۱ گرم) بطور جداگانه برش داده شد و بعد از وزن کردن ، بوسیله قیچی کوچک به قطعات ریز تقسیم و به نسبت ۱ به ۵ با آب مقطر مخلوط و بوسیله دستگاه هموژنیزه گردید. سپس با حجم مساوی از اسید کلریدریک ٤ نرمال مخلوط و بمدت ۳۰ دقیقه در آب جوشانده شد تا گلیکوژن موجود هیدرولیز و به گلوکز تبدیل گردد. محتوی لوله ها در حین جوشیدن مخلوط و در پایان سانتریفوژ شده و ۰/۵ میلی لیتر از مایع رویی به ۲/۵ میلی لیتر از محلول فسفات دی پتاسیک ۱ مولار (برای خنثی شدن اسید) اضافه شد. نمونه تا زمان اندازه گیری گلوکز در فریزر نگهداری گردید. مقدار گلوکز نمونه ها بروش آنزیمی (کیت زیست شیمی) اندازه گیری شد و برای تبدیل به گلیکوژن (با توجه به وزن مولکولی واحدهای تشکیل دهنده آن) درعدد ۰/۹ ضرب گردید (۳٦). غلظتmg/kg۱برای میلرینون ، IBMX ، دی پیریدامول و ترکوئینزین و غلظت mg/kg۱۰ برای آمرینون بکار رفت. مقدار انسولین بروش رادیو-ایمنواسی(کیت DiaSorin) اندازه گیری شد. نتایج بصورت میانگین ± SE گزارش و در تجزیه و تحلیل آنها بروش آنالیز واریانس (ANOVA) از نرم افزارهای Excel و Instat برای پردازش داده ها استفاده گردید و در صورت معنی دار بودن تفاوت میانگینها تستهای تکمیلی Tukey-Kraur و Bonferroni بکار رفت. حداقل درجه اطمینان ۹۵٪ ($P<$ ۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

یافته ها

یافته ها نشان داد که ترشح انسولین از جزایر جدا شده رت در حضور گلوکز mM۱۰ نسبت به mM۳ افزایشی حدود ۲/۵ برابر داشت (P=۰/۰۰۰۳). درحالیکه مقایسه غلظتهای۱۰ و ۲۰ میلی مولار تفاوت معنی دار در تحریک ترشح انسولین نشان نداد.

www.SID.ir

Archive of SID

تحریک ترشح انسولین با آمرینون و یا میلرینون (10^{-4}M) در حضور گلوکز۳ میلی مولار نسبت به شاهد تفاوت معنی دار نداشت (جدول۱). آمرینون (10^{-3}) و میلرینون (10^{-5} و 10^{-4}) و ترکوئینزین (10^{-7}،10^{-6} و10^{-5}) مولار در حضور گلوکز۱۰ میلی مولار سبب تحریک معنی دار ترشح انسولین گردیدند ($P<0/05$ ، n=۴–۹). دی پیریدامول (10^{-5} و10^{-4} مولار) درحضور گلوکز ۱۰mM اثر تحریکی بر ترشح انسولین نداشت ($P>0/05$، n=۴–۹).

در گروه شاهد میانگین و انحراف معیار غلظت گلوکز در نمونه خون شریانی از دقیقه ۵ تا ۹۰ در مقایسه با خون ناشتا بمقدار ۲/۹ تا ۳/۷ برابر افزایش نشان داد. مقدار گلوکز از ۸۰ mg/dl در حالت ناشتایی (شروع کار) به غلظت ۱۹±۲۳۳ تا ۱٤± mg/dl ۲۹۹ و غلظت انسولین سرمی از ۲±۱۲ µU/ml در حالت ناشتا به۵± ۴۰ تا۷±۵۷ (µU/ml) رسید که حدود ۳/۳ تا ۴/۷۵ برابر افزایش نشان داد (جدول۲). با تزریق IBMX بمقدار ۱mg/kg در ابتدای تزریق گلوکز هیپرتونیک بجز نمونه دقیقه ۵، در تمامی نمونه ها، کاهش معنی دار غلظت گلوکز پلاسما نسبت به گروه شاهد دیده شد ($P<0/01$). با اینحال مقدار انسولین (جدول۲) در هیچکدام از نمونه ها تفاوت معنی دار با گروه شاهد در زمانهای مشابه نداشت ($P>0/05$). تزریق میلرینون (۱mg/kg) سبب کاهش گلوکز پلاسمای رتها گردید و از دقیقه ۵ تا ۹۰ این کاهش معنی دار بود ($P<0/05$). غلظت انسولین پلاسما در این گروه تنها در دقایق ۱۰، ۱۵ و ۳۰ افزایش معنی دار داشت ($P<0/05$). تزریق آمرینون (۱۰mg/kg) فقط تا دقیقه ۳۰ سبب کاهش معنی دار گلوکز پلاسما شد (جدول ۲). هرچند که در این مدت غلظت انسولین پلاسما کمتر از گروه شاهد بود ($P<0/05$). درگروهی از رتها که دی پیریدامول بمقدار ۱ میلیگرم بر کیلوگرم تزریق شده بود، غلظت گلوکز دردقایق ۵تا۱۵ با گروه شاهد اختلاف معنی دار داشت ($p<0/05$) و غلظت انسولین در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی دار نشان نداد ($P>0/05$). غلظت گلوکز در گروه ترکوئینزین در تمام طول کار از دقیقه ۵ تا ۹۰ کاهش شدید و معنی دار داشت. با این وجود غلظت انسولین پلاسمایی تنها در دقایق ۵ ،۱۰ و۹۰ دارای اختلاف معنی دار با گروه شاهد در زمانهای مشابه بود ($P<0/05$). میانگین ± SD غلظت گلیکوژن کبدی در گروه شاهد برابر ۴±۵۷ میلیگرم بر گرم محاسبه گردید(جدول۳). تمامی ترکیبات مورد استفاده بجز دی پیریدامول ، موجب کاهش ذخیره گلیکوژن کبدی در شرایط تزریق مداوم گلوکز هیپرتونیک شدند. در گروههای IBMX، آمرینون و ترکوئینزین اختلاف با گروه شاهد معنی دار بود($P<0/05$). درحالیکه گروه میلرینون فاقد تفاوت معنی دار با گروه شاهد بود ($P>0/05$). از سوی دیگر دی پیریدامول موجب افزایش شدید و معنی دار ذخیره گلیکوژن کبدی رتها شد. میانگین و انحراف معیار در این گروه به ۷۵ ± ۵mg/gr رسید ($P<0/05$).

جدول۱: میانگین و خطای استاندارد ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جدا شده رت برحسب میکروواحد بر میلی لیتر در حضور دارو+ گلوکز ۱۰ میلی مولار و گروه شاهد (گلوکز۱۰ میلی مولار)، n=۴–۹.

(میلی مولار)	گلوکز (۳)	گلوکز (۱۰)	میلرینون (۰/۱)	آمرینون (۱)	ترکوینزین (۰/۰۰۰۱)	دیپیریدامول (۱)
انسولین	۱۴±۱	۳۳±۳	۵۰± ۴	۴۲ ± ۴	۴۹ ±۳	۳۶ ±۱

جدول۲: میانگین و خطای استاندارد غلظت گلوکز و انسولین پلاسما (بترتیب برحسب میلیگرم در دسی لیتر و میکروواحد در میلی لیتر) در شرایط تزریق دارو و گلوکز هیپرتونیک و گروه شاهد (سرم فیزیولوژیک و گلوکز هیپرتونیک) در رتهای بیهوش در طی ۹۰ دقیقه

ترکیب	ناشتا	شاهد	IBMX	میلرینون	آمرینون	ترکوینزین	دی پیریدامول
گلوکز پلاسما	۸۰±۱۰	۲۶۶ ±۱۶	۱۹۴±۹	۲۰۷ ±۱۶	۲۰۴ ±۹	۱۷۷ ±۱۵	۲۳۰ ±۱۲
انسولین	۱۲±۲	۴۸±۶	۵۱±۵	۵۲±۳	۳۶ ±۲	۵۸±۳	۴۴±۲

جدول۳: میانگین و خطای استاندارد غلظت گلیکوژن کبدی برحسب میلی گرم بر گرم در شرایط تزریق دارو و گلوکز هیپرتونیک و گروه شاهد (سرم فیزیولوژیک و گلوکز) در رتهای بیهوش در پایان ۹۰ دقیقه، n=۵–۷

ترکیب	شاهد	IBMX	میلرینون	آمرینون	ترکوینزین	دی پیریدامول
گلیکوژن	۵۷±۴	۴۳±۳	۴۷±۵	۴۵±۴	۴۶±۲	۷۵±۵

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

اثر مهارکننده های PDE درواکنشها و بافتهای مختلف بررسی شده و تفاوت اثر و عملکرد آنها (حتی از نظر مکانیسم و نحوه اثر) در مطالعات قبلی مشاهده شده است. نکته قابل توجه آنست که این تفاوت نه تنها در بین مهارکننده های انتخابی و غیرانتخابی و یا بین مهارکننده های انتخابی خانواده های مختلف ایزوآنزیمها ، بلکه بین مهارکننده های انتخابی یک خانواده معین از ایزوآنزیمها هم مشاهده میشود. بطوریکه تفاوت اثر آمرینون و میلرینون بعنوان مهارکننده های انتخابیPDE3 درجلوگیری از روندهای التهابی در عضله قلب توسط Chanani و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش گردیده و نتیجه گرفته شد که آمرینون اثر ممانعت کننده بر تولید سیتوکینهای التهابی دارد(۳۷). در سال۲۰۰۰ نیزIribe و همکاران اثر متفاوت میلرینون، آمرینون و اولپرینون بر متابولیسم اکسیژن در ورید کبدی را گزارش کرده اند. زاپریناست نیز بعنوان مهارکننده PDE1 و PDE5 در برخی شرایط و مطالعات سبب تحریک و در برخی سبب مهار ترشح انسولین شده است(۳۸). در تحقیق حاضر نیز که از میلرینون، آمرینون و ترکوئینزین بعنوان مهارکننده های انتخابی PDE3 و دی پیریدامول بعنوان مهارکننده انتخابی PDE5 و از IBMX بعنوان مهارکننده غیرانتخابی PDE استفاده شده است، در برخی از روندهای مورد مطالعه از جمله مقدار گلوکز، انسولین و گلیکوژن کبد رت در شرایط تزریق مداوم گلوکز هیپرتونیک و ترشح انسولین از جزایر جدا شده رت تفاوتهایی مشاهده گردید که به تفصیل مورد بحث قرار میگیرد. از آنجاکه اثر تحریکی گلوکز بر ترشح انسولین توسط cAMP تقویت میگردد، بررسی نحوه تحریک ترشح انسولین توسط مهارکننده های PDE از نظر میزان اثربخشی، الگوی ترشح انسولین و طول اثر ترکیبات مذکور از اهمیت ویژه برخوردار است. اثر افزاینده ترشح انسولین توسط مهار کننده های فسفودی استرازها در سلولهای توموری مترشح انسولین و جزایر جدا شده انسان و رت مشاهده شده است. هرچند که نتایج حاصل از مطالعات مختلف در تمام موارد یکسان نیست(۳۹و۴۰). گلوکز بعنوان اصلی ترین تنظیم کننده فیزیولوژیک ترشح انسولین و واسطه اصلی در تحریک ترشح انسولین بوسیله بسیاری از عوامل دیگر بشمار میرود و در غلظتهای هیپرگلیسمیک بطور مستقیم سبب افزایش ترشح انسولین میشود(۴۱-۴۳). از اینرو درمطالعه حاضر نیز برای بررسی اثر مهارکننده های PDE بر ترشح انسولین از جزایر جدا شده و نیز در شرایط تزریق مداوم گلوکز هیپرتونیک و بررسی تغییر مقدار گلوکز و انسولین در حضور مهارکننده ها، گلوکز بعنوان محرک ترشح بکار رفت. انکوبه کردن جزایر در حضور محلول گلوکزmM۱۰سبب افزایش۲/۵ برابری در ترشح انسولین نسبت به گلوکزmM ۳ گردید ($P<۰/۰۰۱$). بمنظور اطمینان از ایجاد حداکثر تحریک ترشح در جزایر، از محلول گلوکزmM۲۰ نیز برای انکوباسیون استفاده شد که افزایش ترشح انسولین در مقایسه با محلول mM ۱۰ تفاوت معنی دار نشان نداد ($P>۰/۰۵$). مهارکننده های PDE اثر تحریکی بر ترشح انسولین از جزایر جدا شده رت را از طریق افزایش غلظت cAMP اعمال میکنند(۲۰و۲۱و ۳۹) و در سلولهای بتا ایزوآنزیمهای مختلفی از خانواده PDE وجود دارد که بنظر میرسد فعالیت PDE1 ، PDE3 و PDE4 مهمتر از سایر ایزوآنزیم ها می باشد(۴۵)، هرجند که PDE3B نقش برجسته تری درتنظیم ترشح انسولین از سلولهای بتا (۳۹) و متابولیسم کبدی دارد (۲۷و۴۶). ازاینرو مکانیسمهای دخیل در تنظیم فعالیت PDE3 در سلولهای بتا همواره مورد توجه بوده است (۴۰و۴۴). اما در مجموع اطلاعات مولکولی و فونکسیونی اندکی در مورد ایزوآنزیمهای PDE3 در سلولهای بتای پانکراس در دست است(۳۹). در این مطالعه از میلرینون ($۱۰^{-۴}$ و $۱۰^{-۵}$)، آمرینون ($۱۰^{-۳}$) و ترکوئینزین($۱۰^{-۵}$،$۱۰^{-۶}$و$۱۰^{-۷}$) مولار بعنوان مهارکننده های انتخابی PDE3 در محلول انکوباسیون جزایر جدا شده از رت استفاده شد که سبب افزایش معنی دار در ترشح انسولین تحریک شده توسط گلوکز نسبت به نمونه های کنترل گردید ($P< ۰/۰۵$). درحالیکه استفاده از دی پیریدامول (M$۱۰^{-۵}$ و$۱۰^{-۴}$) اثری بر مقدار انسولین ترشح شده از جزایر نداشت ($P>۰/۰۵$). بدین ترتیب نقش مهار ایزوآنزیمهای PDE3 در ترشح انسولین تحریک شده توسط گلوکز مشخص میگردد. با وجود این قدرت اثر این ترکیبات با یکدیگر متفاوت بوده و از این نظر ترکوئینزین قویترین ترکیب و آمرینون ضعیفترین آنها میباشد. این تفاوت در قدرت اثر میتواند ناشی از اختلاف در میزان حساسیت ایزوآنزیمهای PDE3 بیان شده در جزایر نسبت به ترکیبات مهارکننده ، قدرت اثر درونی و یا فارماکوکینتیک (میزان حلالیت و نفوذ به سلول و ...) باشد. از سوی دیگر مشخص میگردد که مهارکننده های PDE3 اثری بر ترشح بازال انسولین (در حضور گلوکز ۳ میلی مولار) ندارند ($P>۰/۰۵$).

برای استفاده از مهارکننده های PDE بمنظور پیشگیری یا درمان دیابت، پی بردن به اختلافات موجود بین ایزوآنزیمهای موجود در سلولهای بتا و دسترسی به مهارکننده های انتخابی تر قبل از مصرف وسیع آنها ضروری بنظر میرسد(۳۹و۴۷). در سلولهای توموری ترشح شده انسولین نوع ایزوآنزیم موثر در ترشح متفاوت است و در برخی مهار PDE1 و در برخی دیگر مهار PDE3 اثری بر ترشح انسولین ندارد(۳۹). درحالیکه زاپریناست (مهارکننده PDE1/PDE5) سبب مهار ۱۴ تا ۳۰ درصدی فعالیت PDE در جزایر رت و مهار ۲۵ درصدی PDE3 در کشت سلولهای مترشح انسولین میشود(۴۸). با توجه به تفاوت اثر زاپریناست و دی پیریدامول از نظر مهار PDE1 در مطالعات قبلی و عدم تغییر ترشح انسولین در حضور دی پیریدامول در مطالعه حاضر ، تفاوت در قدرت اثر ایندو ترکیب یا اختلاف در بیان آنزیم در بافتهای مختلف (جزایر طبیعی جدا شده و رده های کشت سلولی خاص) و ضعیف بودن نقش ایزوآنزیم PDE5 در فیزیولوژی ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس رت مطرح میگردد. در مطالعات in-vivo کاربرد غیرخوراکی گلوکز با حذف اثر القایی هورمونهای

www.SID.ir

Archive of SID

گوارشی محرک ترشح انسولین نظیر GLP-1, VIP, GIP ، سکرتین، گاسترین و کوله سیستوکینین(۱۷)، از تعدد عوامل مداخله کننده در ترشح انسولین تحریک شده توسط گلوکز می کاهد و اثرات مشاهده شده را با اطمینان بیشتری میتوان تفسیر کرد و ارتباط آنرا با عامل خاص اثبات یا رد نمود. در مطالعه حاضر برای بررسی اثر مهارکننده های PDE بر غلظت انسولین و گلوکز سرمی و مقدار گلیکوژن کبدی در حیوان بیهوش از گلوکز هیپرتونیک (۰/۵ gr/kg برای بارگیری و ۱/۵ gr/kg/hrبرای انفوزیون) بعنوان محرک ترشح استفاده گردید. افزایش غلظت گلوکز به میزان ۲/۹ تا ۳/۷ برابر و انسولین بمیزان ۳/۳ تا ٤/۷۵ برابر(نسبت به حالت ناشتا) در گروه شاهد نشان دهنده بروز تحریک کافی برای ارزیابی میزان اثر مهارکننده های PDE است. Degerman و همکاران (۲۰۰٤) با تجویز خوراکی گلوکز و میلرینون با غلظتهای مختلف به موش کوچک بیهوش نتیجه گرفتند که تجویز خوراکی میلرینون در شرایط تجویز وریدی گلوکز برخلاف تجویز خوراکی آن سبب افزایش ترشح انسولین نمیشود (٤۹). در مطالعه حاضر بلافاصله بعد از تزریق وریدی مهارکننده های PDE به رتهای بیهوش تزریق مداوم گلوکز هیپرتونیک شروع وبمدت ۹۰ دقیقه ادامه یافت. در این شرایط IBMX و تمامی مهار کننده های PDE3 سبب کاهش غلظت پلاسمایی گلوکزبمقدار متفاوت گردیدند. بطور همزمان سطح انسولین پلاسمایی در گروه IBMX تفاوت معنی دار با گروه شاهد نداشت. در مورد گروه میلرینون کاهش معنی دار غلظت گلوکز در تمام مدت تزریق و افزایش معنی دار غلظت انسولین تنها در دقیقه ۳۰ دیده شد.

ایزوآنزیم PDE3B در سلولهایی که از نظر متابولیسم و هوموستاز انرژی اهمیت دارند(٤۰و۵۰)، از جمله سلولهای بتای پانکراس ، بافت چربی و هپاتوسیتها بیان میشود(۲٤و۲۷و۳۹و۵۱–۵۳) و اثر مستقیم انسولین بر گلیکوژن کبدی از طریق تحریک فعالیت PDE3B و مهار آدنیلات سایکلاز اعمال و سبب کاهش غلظت داخل سلولی cAMP میگردد(۵٤). فعال شدن PDE3B وکاهش cAMP و افزایش فعالیت فسفاتاز سبب غیرفعال شدن گلیکوژن فسفریلاز و فعال شدن گلیکوژن ستتاز میشود. تحریک گلیکوژن ستتاز توسط انسولین برای ذخیره و تجمع گلیکوژن در عضلات اسکلتی و کبد لازم میباشد(۲٤،٤۷و۵۵–٦۱). انسولین تنها هورمونی است که میتواند سبب ذخیره انرژی گردد و در مقابل چهار هورمون گلوکاگون، اپی نفرین، کورتیزول و هورمون رشد سبب آزادی انرژی از ذخایر بدن میشوند (٦۲و٦۳). الگوی ذخیره گلیکوژن در انسان وموش متفاوت است(٦٤). میزان ذخیره کبدی گلیکوژن بسته به شرایط تغذیه از ۱ تا ۱۰۰ میلیگرم در هر گرم از کبد تغییر میکند(٦۵). طبق نظر Abdollahi در سال ۲۰۰۳، افزودن میلرینون و آمرینون در محیط هپاتوسیتهای جدا شده باعث تحریک گلوکونئوژنز، افزایش گلیکوژنولیز و تولید کبدی گلوکز میگردد. بطوری که نگهداری هپاتوسیتهای ایزوله شده بمدت ۲ ساعت در محلول ۵۰ میکرو مولار مهارکننده های PDE3 و PDE4 سبب افزایش غلظت cAMP در سلول گردید (٦٦). در سال ۱۹۹۸، Hermsdorf و همکاران مهار سنتز گلیکوژن توسط مهارکننده های PDE3 ، PDE4 و نیز IBMX در هپاتوسیتهای کشت شده را گزارش کرده اند(٦۷). از طرف دیگر نیمی از انسولین موجود در جریان خون ورید باب توسط کبد برداشته میشود و نوسانات کوچک در غلظت انسولین از خون محیطی حذف میگردد(٦۸). طبق گزارش Okuda وUchikawa (هردو ۱۹۹۲) و همکارانشان سیلوستازول، وسنارینون ، انوکسیمون و یا میلرینون (مهارکننده انتخابی PDE) اثری بر گلوکز خون و یا متابولیسم گلوکز نداشته اند(٤۸). بنابه گزارش Rose در سال ۲۰۰۲ نیز کافئین و دی پیریدامول تغییری در برداشت گلوکز ایجاد نمیکنند(٦۷).

نتیجه گیری

استفاده از مهارکننده های PDE3 چه در تحریک ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جدا شده رت و چه در کاهش گلوکز پلاسما در رت هیپرگلیسمیک ، نشان دهنده نقش مفید این ترکیبات میباشد. با این وجود ، بواسطه وسعت انتشار و تنوع روندهای قابل تنظیم توسط cAMP در سلولهای مختلف ، کاربرد این ترکیبات مستلزم بررسیهای بیشتری است و با توجه بوجود انواع مختلفی از ایزوآنزیمهای PDE در کبد و تفاوت زمانی در کاهش گلوکز و افزایش انسولین پلاسما ، بررسی اثر هریک از مهارکننده ها بر روندهای آنزیمی کبد و اندازه گیری غلظت انسولین در شرایط مذکور در ورید کبدی لازم بنظر میرسد.

تقدیر و تشکر

مولفین از همکاران بخش فارماکولوژی دانشکده پزشکی مشهد برای تقبل زحمات و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد برای تامین بودجه مورد نیاز این پژوهش و جناب آقای دکتر ابوالقاسم امینی (متخصص علوم آزمایشگاهی) برای همکاری صمیمانه در تهیه برخی ترکیبات شیمیایی از منابع خارجی، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Owens DR, Zinman B, Bolli GB. Insulin today and beyond. *The Lancet*, 2001; **358**: 739-746.
2. Gupta R, Kumar G, kumar RS: An update on cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors: phosphodiesterases and drug selectivity. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2005; **27**(2): 101-18.
3. Lungier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the

www.SID.ir

Archive of SID

development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther.* 2006; **109**(3): 366-98
4. Kulkarni SK, Patil CS. Phosphodiesterase 5 enzyme and its inhibitors: update on pharmacological and therapeutical aspects. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2004; **26**(10):789-99.
5. Zhang KY, Card GL, Suzuki Y, Artis DR, Fong D. A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. *Mol Cell*, 2004; **15**(2):279-86.
6. Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, et al. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nature Cell Biology*, 2000; **2**: 805 – 811.
7. Menniti FS, Faraci WS, Schmidt CJ. Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; **5**(8): 660-70.
8. Chabardes D, Imbert-Teboul M, Elalouf JM. Functional properties of Ca2+ inhibitable type 5 and type 6 adenylyl cyclases and role of Ca2+ increase in the inhibition of intracellular cAMP content. *Cell Signal*. 1999; **11**(9): 651–663.
9. Skalhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential experssion, regulation and subcellular localization of subunits of PKA.*Frontiers in biosciences*, 1997; **2**: 331-342.
10. Wheeler MA, Ayyagari RR, Wheeler GL, Weiss RM. Regulation of cyclic nucleotides in the urinary tract. *J Smooth Muscle Res.* 2005; **41**(1): 1-21.
11. Mayer M, Stief CG, Truss MC, Uckert S: Phosphodiesterase inhibitors in female sexual dysfunction. *World J Urol.* 2005; **23**(6): 393-7
12. Bischoff E: Potency, selectivity and consequences of nonselectivity of PDE inhibition.*Int J Impot Res.* 2004; 16 Suppl 1:S11-4
13. Keravis T, Thaseldar-Roumie R, Lugnier C: Assessment of phosphodiesterase isozyme contribution in cell and tissue extracts. *Methods Mol Biol.* 2005; **307**:63-74
14. Bingham J, Sudarsanam S, Srinivasan S. Profiling human phosphodiesterase genes and splice isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; **350**(1): 25-32.
15. Francis SH, Blount MA, Zoraghi R, Corbin JD. Molecular properties of mammalian proteins that interact with cGMP: protein kinases, cation channels, phosphodiesterases, and multi-drug anion transporters. *Front Biosci.* 2005; **10**: 2097-117
16. Baxendale RW, Fraser LR: Mammalian sperm phosphodiesterases and their involvement in receptor-mediated cell signaling important for capacitation. *Mol Reprod Dev.* 2005; **71**(4): 495-508.
17. Hardman JG, Limbrd LE, Gilman AG. *Good & Gilman's, the pharmacological basis of therapeutics*. 10th Ed. New York, McGraw-Hill, 2001; pp: 1679-1701.
18. Bender AT, Beavo JA. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases; Molecular Regulation to Clinical Use(Review Article). *Pharmacol Rev* **58**: 488-520, 2006.
19. Waldkirch E, Uckert S, Yildirim H, Sohn M, Jonas U. Cyclic AMP-specific and cyclic GMP-specific phosphodiesterase isoenzymes in human cavernous arteries immunohisto-chemical distribution and functional significance. *World J Urol.* 2005; **23**(6): 405-10
20. Shafiee-Nick R, Pyne NJ, Furaman BL. Effects of type-selective phosphodiesterase inhibitors on glucose-induced insulin secretion and islet phosphodiesterase activity. *British Journal of Pharmacology*, 1995; **115**: 1486-1492
۲۱. پریـزاده س م ر، شـفیعی نیک ر، زهرایی م. مقایسه بین اثرات انـسولینوتروپیک میلـرینون و آمرینون، مهارکننده های انتخابی PDE3 در شـرایط بـرون تنی و درون تنی. مجله علوم پایه پزشکی ایران ۱۳۸۰ جلد ٤ شماره ۱ ص ۷ تا ۱۵
22. Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2diabetes. *Cell*, 2001; **104**: 517–529.
23. Galetic I, Andjelkovi M, Meier R, Brodbeck D, Park J, Hemmings BA. Mechanism of protein kinase B activation by insulin/IGF-1 revealed by specific Inhibitors of PI3-kinase significance for diabetes and cancer. *Pharmacol. Ther.* 1999; **82** (2–3): 409–425.
24. Roith DL, Zick Y. Recent advances in our understanding of insulin action and resistance. *Diabetes Care*, 2001; **24**: 588-597.
25. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action, implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *The New England J. of Medicine.* 1999; **341**: 248-257.
26. Jun HS, Bae HY, Lee BR, Koh KS, Kim YS, Lee KW, et al. Pathogenesis of non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus (NIDDM) genetic predisposition and metabolic abnormalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1999; **35**: 157–177.
27. Ahlstrom MEB. Cyclic nucleotide inactivation in osteoblasts and osteosarcoma cell lines. Department of Ecology and Systematics, Division of Instruction in Swedish. University of Helsinki Academic dissortation, Helsinki, Finland, 2001. Availble at: http://ethesis. helsinki. fi, Yliopistopaino.
28. Ahlstrom M, Pekkinen M, Huttunen M, Lamberg-Allardt C. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) in human osteoblastic cells; the effect of

www.SID.ir

Archive of SID

PDE inhibition on cAMP accumulation. *Cell Mol Biol Lett.* 2005; **10**(2): 305-19.
29. Steinberg GR, Macaulay SL, Febbraio MA, Kemp BE. AMP-activated protein kinase- the fat controller of the energy railroad. *Can j Physiol Pharmacol.* 2006; **84**: 655-665.
30. Lerner A, Epstein PM. Cyclic nucleotide phosphodiesterases as targets for treatment of haematological malignancies. *Biochem J.* 2006; **393**(Pt 1): 21-41
31. Jeon YH, Heo YS, Kim CM, Hyun YL, Lee TG, Ro S, et al: Phosphodiesterase; Overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development.*Cell Mol Life Sci.* 2005; **62**(11): 1198-220
32. Montorsi F, Corbin J, Phillips S. Review of phosphodiesterases in the urogenital system: new directions for therapeutic intervention. *J Sex Med.* 2004; **1**(3): 322-36.
33. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2006; 147 Suppl 1: S252-7.
34. Huai Q, Wang H, Zhang W, Colman RW, Robinson H, Ke H. Crystal structure of phosphodiesterase 9 shows orientation variation of inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; **101**(26): 9624-9.
35. Lotfi S, Li Z, Sun J, Zuo Y, Lam P, Kang Y. Role of the Exchange Protein Directly Activated by Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate (Epac) Pathway in Regulating Proglucagon Gene Expression in Intestinal Endocrine L Cells. Endocrinology, 2006, **147**(8): 3727-3736.
۳۶. زاهدی اصل ص، مراحل ح، زارع‌بوایی ب: بررسی اثر عصاره‌های کلروفرمی و آبی الکلی بذر گندی تلخه روی غلظت گلوکز پلاسما و میزان گیلکوژن کبدی در موش صحرایی، چهاردهمین کنگره فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران دانشگاه علوم پزشکی تهران ۲۶-۳۰ اردیبهشت ۱۳۷۸
37. Chanani NK,Cowan DB,Takeuchi K, Poutias D, Garcia LM, et al: Differential effects of amrinone and milrinone upon myocardial inflammatory signaling. *Circulation*, 2002; **106**: I284-9.
38. Iribe G, Yanada H, Matsunaga A, Yoshimura N. Effects of the phosphodi- esterase III inhibitors olprinone, milrinone, and amrinone on hepatosplanchnic oxygen metabolism. *Crit Care Med* 2000, **28** (3): 743-748
39. Harndahl L, Jing XJ, Ivarsson R, Degerman E, Ahren B, et al. Important role of PDE3B for the stimulatory action of cAMP on pancreatic beta-cell exocytosis and release of insulin. *J Biol Chem*, 2002; **277**(40): 37446-55.
40. Degerman E, Holst LS, Edgren G, Landström T, Oknianska A, et al. Molecular mechanisms involved in the development of type 2 diabetes with focus on insulin signalling/insulin secretion and the cyclic nucleotide signalling systems. Dept. of Cell and Molecular Biology, Research project at the Medical Faculty, Lund Univ, 2003. Available at: http://www.cmb.lu.se/ molsign/transduction
41. Koeslag jH, Saunders PT, Wessels JA. Glucose homeostasis with infinite gain; further lessons from the daisyworld parable. J. *Endocrinology*, 1997; **154**: 187-92.
42. Zawalich WS, Eymard MB, Zawalich K. Signal transduction in pancreatic beta cells; regulation of insulin secretion by information flow in the PLC/protein kinase C pathway. *Frontiers in Bioscience*, 1997; **2**: 160-172.
43. Borelli MI, Gagliardino JJ. Possible modulatory effect of endogenous islet catecholamines on insulin secretion. *BMC Endocrine Disorders*, 2001; **1**: 1.
44. Sasahi T, Kotera J, Omori K. Novel alternative splice variants of rat PDE7B showing unique tissue-specific expression and phosphorylation. *Biochem.J.*2002; **361**: 211-220.
45. Resjo S, Okinhanska A, Zolnierowicz S, et al: Phosphorylation and activation of phosphodiesterase type 3B (PDE3B) in adipocytes in response to serine/threonine phosphatase inhibitors: deactivation of PDE3B in vitro by protein phosphatase type 2A. *Biochem J.* 1999; **341**: 839-845
46. Shitsukawa K, Andersen CB, Richard FJ, Horner AK, Wiersma A. Cloning and characterization of the cGMP-Inhibited phosphodiesterase PDE3A expressed in Mouse Oocyte. *Biology of Reprod*. 2001; **65**:188-196.
47. Conti M: Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine Cells. Molecul. *Endocrinology*, 2000; **14**(9): 1317-1327.
48. Pyne NJ, Furman BL: Cyclic nucleotide phosphodiesterases in pancreatic islets. *Diabetologia*. 2003; **46**(9): 1179-89.
49. Degerman E, Manganiello V, Holst JJ, Ahren B. Milrinone efficiently potentiates insulin secretion induced by orally but not intravenously administered glucose in C57BL6J mice. *Eur J Pharmacol*. 2004; **498**(1-3): 319-23.
50. Snyder PB: The adipocyte cGMP- inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3B) as a target for lipolytic and thermogenic agents for the treatment of obesity. *Emerging therapeutic targets*. 1999; **3**(4): 587-599.
51. Laviola L, Perrini S, Cignaralli A, Giorgino F. Insulin signalling in human adipose tissue. Archives of physiology and Biochemistry, 2006; **112**(2): 82-88.
52. Hribal ML, Oriente F, Accili D. Mouse models of insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002; **282**(5): E977-E981.

www.SID.ir

Archive of SID

53. Mei Y, Holst LS, Landström TR, Holm C, Brindley D. C_2-ceramide influences the expression and insulin-mediated regulation of PDE3B and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 2002; **51**: 631-637.
54. Peicher MV, Curi R, Pagliarini S, Nascimento KF, Bazotte RB. Responsive- ness of glycogen breakdown to cAMP in perfused liver from rats with insulin-induced hypoglycemia. *Braz J Med Biol Res,* 2003; **36**(1) 45-51.
55. Alessi DR, Downes CP. The role of PI 3-kinase in insulin action (Review). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998; **1436**:151-164.
56. Van haesebroeck B , Waterfield MD. Signaling by Distinct Classes of Phosphoinositide-Kinases. *Experimental Cell Research,* 1999; **253**: 239–254
57. Azpiazu I, Manchester J, Skurat AV, Roach PJ, Lawrence JC: Control of glycogen synthesis is shared between glucose transport and glycogen synthase in skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000; **278** (2): E234-E243.
58. Rubin D. Growth metabolism. Intro to endocrinology BSC 345, chapter 7& 19, lecture 08, 2003, Available at: www.bio.ilstu.edu/ rubinlab/endocrinology/lectures/lecture08-Glucose & GH Metb.pdf.
59. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide3-kinase; Implications for development, immunity, homeostasis, and cancer. *Annu Rev. Cell Dev. Biol*., 2001; **17**:615–75.
60. Frick F. GH, IGF-1 and insulin in the regulation of lipid and lipoprotein metabolism. Department of physiology. Goteborg University. Sweden, 2001. Available at: www.physiology.gu.se/endo /Dissertations/Frick /avhandling.
61. Baumann CA, Saltiel A. Spatial compart-mentalization of signal transduction in insulin action. *BioEssays*, 2001; **23**: 215-222.
62. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action, implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *The New England J. of Medicine*, 1999; **341**: 248-257 .
63. Eyster KM. Introduction to Signal Transduction. A prime for untangling the web of intracellular messengers. *Biochemical Pharmacology*, 1998**;** **55**: 1927–1938.
64. Kasuga M, Ogawa W, Ohara T. Tissue glycogen content and glucose intolerance. *J. Clin. Invest.* 2003; **111**: 1282-1284.
65. Bollen M, Keppens S, Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver (Review article). *Biochem J.* 1998; **336**: 19-31
66. Abdollahi M, Chan TS, Subrahmanyam V, O'Brien PJ. Effects of PDE3, 4, 5 inhibitors on hepatocyte cAMP levels, glycogenolysis, gluconeogenesis and susceptibility to a mitochondrial toxin. *Mol Cell Biochem*, 2003; **252**(1-2): 205-211.
67. Hermsdorf T, Dettmer D. Combined effects of insulin and dexamethasone on cAMP phosphodiesterase 3 and glycogen metabolism in cultured rat Hepatocytes. *Cellular Signalling*, 1998; **10**(9): 629-635
68. Westerlund J. Pulstile insulin release from singlr islets of langerhans. Comperhensive summaries of Uppsala dissertation from the faculty of medicine,2000: 945-49.Availble at:www.World catlibraries.org/wcpa/top3mset/00e 36671bbd 8499aa19afeb4da09e526 .html.

www.SID.ir