مجله دیابت و لیپید ایران. پاییز ۱۳۸۷؛ دوره۸(شماره ۱) ۵۴-۴۵

ارتباط سطح فاکتور رشد اندوتلیال عروقی ویتره(VEGF) با سطح VEGF سرم، کنترل دیابت و میکروآلبومینوری در رتینوپاتی پرولیفراتیو دیابتی

نصرت اله ضرغامی*[۱] ،نادر بهاری وند[۲]، علی مهدوی فرد[۲]، عباس مهاجری[۱]

چکیده

مقدمه: رتینوپاتی دیابتی یکی از جدی ترین عوارض ناشی از اختلال میکروواسکولر شبکیه است. بیماری دیابت منجر به افزایش تظاهر عوامل رشد رگ ساز در برخی بافت‌ها در پاسخ به هیپرگلیسمی و ایسکمی بافتی می شود. به علاوه، فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF) به عنوان عامل میتوژن قوی اندوتلیال و عامل نشت پذیری عروقی شناخته شده است. شواهد اخیر بر نقش مستقیم VEGF در پاتوژنز رتینوپاتی تکثیری دیابتی دلالت دارند. هدف از این مطالعه، بررسی رابطه بین سطوح VEGF مایع ویتره با آلبومینوری و درجه کنترل قند خون در بیماران دچار رتینوپاتی تکثیری دیابتی است.

روش‌ها: ۳۰ بیمار مبتلا به رتینوپاتی تکثیری دیابتی و ۳۵ شاهد مبتلا به رتینوپاتی تکثیری غیردیابتی که از لحاظ سن و جنس با گروه اول همسان بودند، در یک مطالعه توصیفی-تحلیلی بررسی شدند. سطوح VEGF ویتره و سرم اندازه گیری و بین دو گروه مقایسه گردید. در گروه رتینوپاتی تکثیری دیابتی، سطح سرمی هموگلوبین A1c، میکروآلبومینوری، کراتینین سرم، مراحل نفروپاتی و رتینوپاتی و مدت دیابت قندی نیز تعیین شد. رابطه بین VEGF ویتره و سرم با عوامل مذکور تعیین شد.

یافته ها: ۳۰ بیمار دچار رتینوپاتی تکثیری دیابتی (شامل ۱۹ مرد و ۱۱ زن)، با سن متوسط ۱۰±۵۶ سال وارد مطالعه شدند (۳۵شاهد). سطح متوسط VEGF ویتره و سرم در گروه مورد بطور معنی داری بیشتر بود (به ترتیب ۵۸۸/۶۹±۳۸۳/۱۰ و ۲۴۵/۵۵±۵۱۵/۱۲ pg/ml در برابر ۱۰/۹۷±۲۴/۸۱ و ۲۷۴/۵۵±۳۴۳/۵۸ pg/ml ؛ P=۰/۰۰۱، P=۰/۰۱۱)(شاهد). همبستگی بالا و معنی داری بین سطوح VEGF ویتره و سرم مشاهده گردید (P=۰/۰۱۲، r=۰/۴۵۳). VEGF سرم بطور معنی داری در بیماران تحت درمان دارویی (P=۰/۰۴۵)، کنترل خوب قند خون (P=۰/۰۳۹) و مرحله ۱ نفروپاتی (P=۰/۰۴۲) پایین تر بود. همچنین همبستگی معنی داری بین سطح VEGF سرم و نسبت آلبومین ادرار به کراتینین خون مشاهده شد (P=۰/۰۱۷، r=۰/۴۳۲). روابط دیگر معنی دار نبودند (P>۰/۰۵).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه ما مشابه موارد گزارش شده در سایر بررسی ها می باشد. عوامل پایین آورنده سطح VEGF سرم و ویتره، ممکن است در بیماران دچار رتینوپاتی تکثیری دیابتی از ارزش بالایی برخوردار باشند؛ به ویژه اگر در مراحل اولیه تجویز گردند.

واژگان کلیدی: رتینوپاتی تکثیری دیابتی، ویتره، فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی، نفروپاتی، هموگلوبین A1c

۱- مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۲- دپارتمان افتالمولوژی، بیمارستان نیکوکاری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

*نشانی: تبریز، مرکز تحقیقات علوم تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، پست الکترونیک:zarghami@tbzmed.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۰۶ تاریخ درخواست اصلاح: ۸۷/۰۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۸۷/۰۷/۲۰

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

دیابت، بیماری فراگیری در سراسر دنیا بشمار می رود. این بیماری باعث طیفی از عوارض سیستمیک طولانی مدت می گردد که تاثیر قابل توجهی هم بر سلامت بیمار و هم بر جامعه دارند. علت این است که این بیماری افراد را اغلب در فعال ترین مراحل زندگی درگیر می سازد. عوارض چشمی دیابت شامل اختلالات قرنیه، گلوکوم، ایجاد عروق جدید مردمک[1] ، کاتاراکت و نوروپاتی است. با این حال، شایع ترین و تهدیدکننده ترین عارضه چشمی، رتینوپاتی دیابتی است [۱]. در ایالات متحده، ۱۶ میلیون دیابتی وجود دارند که نزدیک به ۵۰٪ آنها از بیماری خود مطلع نیستند. در بیماران مشخص، تنها نیمی مراقبت چشمی دریافت می کنند. بنابراین تعجب آور نیست که رتینوپاتی دیابتی دلیل اصلی کوری جدید در افراد ۲۵ تا ۷۴ ساله باشد. این بیماری علت ۸۰۰۰ مورد در سال کوری جدید است؛ یعنی دیابت مسؤول ۱۲٪ کل موارد کوری است. درمان رتینوپاتی دیابتی مستلزم صرف هزینه های زیادی است؛ با این حال نسبت به هزینه های سایر عوارض دیابت کمتر می باشد [۲]. رتینوپاتی دیابتی به دو دسته عمده تقسیم می گردد: رتینوپاتی دیابتی غیرتکثیری (NPDR) و رتینوپاتی دیابتی تکثیری (PDR) [۳]. سازوکار دقیق رتینوپاتی دیابتی نامشخص است ولی چندین فرضیه و نظریه در این زمینه مطرح شده‌اند که می توان به این موارد اشاره کرد: ***۱) هورمون رشد:*** بنظر می رسد این هورمون در ایجاد و پیشرفت رتینوپاتی دیابتی موثر باشد. نشان داده شده است که رتینوپاتی دیابتی در زنانی که دچار نکروز هموراژیک پس از زایمان غده هیپوفیز شده اند (سندرم Sheehan)، دچار پسرفت می گردد [۴]. ***۲)چسبندگی[2] خون و پلاکت:*** اختلالات متنوع خونی در دیابتی ها دیده می شوند، مانند افزایش تجمع اریتروسیت ها، کاهش انعطاف پذیری گلبول های قرمز خون، کاهش تجمع و اتصال پلاکت ها، آسیب اندوتلیوم و انسداد موضعی مویرگ ها. این عوامل منجر به ایسکمی شبکیه شده، درنتیجه رتینوپاتی دیابتی ایجاد می گردد [۵].

۳) آلدوز- ردوکتاز و عوامل تکثیر عروق: به طور کلی، دیابت بعلت کاهش سطح یا فعالیت انسولین، باعث متابولیسم غیرطبیعی گلوکز می گردد. افزایش سطوح گلوکز خون آثار ساختاری و فیزیولوژیک بر مویرگ های شبکیه داشته و آنها را هم از نظر آناتومیک و هم از نظر عملکردی تغییر می دهد. افزایش مداوم سطح گلوکز خون باعث شانت شدن آن به مسیر آلدوز- ردوکتاز در برخی بافت های خاص می گردد. نتیجه این مسیر، تبدیل قند به الکل است. پری سیت های داخل دیواره ای مویرگ های شبکیه متاثر از این الکل ها شده و دچار اختلال عملکرد می گردند. نتیجه این تاثیر، ضعف و آنوریسمال شدن دیواره عروق است. این میکروآنوریسم ها، علایم اولیه رتینوپاتی دیابتی می باشند. پاره شدن میکروآنوریسم ها منجر به خونریزی سطحی (شعله ای شکل[3]) یا عمقی شبکیه (نقطه نقطه[4]) می گردد [۶]. افزایش نفوذپذیری عروق منجر به نشت مایع و ماده پروتئینی شده که از نظر بالینی بصورت ضخامت رتین و اگزودا دیده می شود. در صورت ایجاد التهاب و اگزودا در ماکولا، کاهش دید مرکزی وجود خواهد داشت. ادم ماکولا شایع ترین علت از دست دادن دید در بیماران دچار رتینوپاتی دیابتی غیرتکثیری است؛ با این حال ممکن است در موارد تکثیری هم وجود داشته باشد [۷]. مناطق ایسکمیک شبکیه، محرک های اساسی جهت آنژیوژنز می باشند. این مسیر از طریق برخی فاکتورهای رشد خاص طی می گردد. فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF)، یکی از موارد مهم در این زمینه است. این فاکتور از دو منبع تولید می گردد: سلول های گلیال شبکیه[5] و سلول های اندوتلیوم عروقی[6] [۸]. VEGF محرک، قوی نفوذپذیری عروق است. این اثر از طریق اعمال تغییرات چشمگیر در محل اتصال سلول های اندوتلیال عروقی بهم در شبکیه رخ می دهد. بایستی توجه کرد که ایجاد این آثار از طریق فعال سازی آبشاری از فاکتورهای مختلف ادامه می یابد. نتیجه نهایی این که

1 - Rris neovascularization
2 - Viscosity

3 - Flame-like
4 - Blot & dot
5 - Retinal gelia cells
6 - Vascular endothelium cells

Archive of SID

www.SID.ir

این فاکتور در ایجاد عروق جدید داخل چشمی در PDR نقش اساسی بر عهده دارد [۹،۱۰].

روش‌ها

در این مطالعه توصیفی- تحلیلی، نمونه های ویتره و خون از بیمارانی که به بیمارستان نیکوکاری تبریز مراجعه و تحت عمل جراحی ویترکتومی قرار گرفتند، جمع آوری گردید. قبل از اخذ نمونه از بیماران، پروتکل مطالعه در کمیته اخلاق پژوهش بیمارستان مورد تصویب و فرم رضایت نامه از بیماران اخذ گردید. معیارهای ورود به مطالعه برای افراد گروه مورد شامل بیماران PDR که نیاز به ویتروکتومی داشتند(خونریزی‌های طولانی مدت ویتره و یا همراه با دکولمان‌های کششی شبکیه و یا هر کدام به تنهایی) و معیارهای ورود افراد کنترل با مشخصات زیر که شامل خونریزی‌های ویتره غیر دیابتی که نیاز به عمل ویترکتومی داشتند(خونریزهای ویتره ناشی از بیماری‌های عروقی ایسکمیک غیر دیابتی به عنوان مثال انسداد شاخه ای و مرکزی ورید شبکیه). ۳۰ بیمار مبتلا به رتینوپاتی تکثیری دیابتی و ۳۵ بیمار مبتلا به رتینوپاتی تکثیری غیردیابتی که از نظر سن و جنس همسان بودند به طور تصادفی انتخاب و وارد مطالعه گردیدند. نمونه های مایع ویتره و خون تام تمام افراد فوق اخذ گردید و بعد از جدا سازی در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آنالیز نگه داری گردیدند.

اطلاعات بیماران از قبیل سن، جنس، مدت ابتلا به دیابت (کمتر و بیشتر از ۱۰ سال)، سطح هموگلوبین A1c، نوع دیابت (۱ و ۲)، نوع درمان دیابت (دارو، انسولین)، پرفشاری خون ، stage نفروپاتی (۳ stage)، سطح سرمی و ویتره VEGF، میزان پروتئینوری و آلبومینوری، میزان کراتینین سرم، شدت رتینوپاتی (۳ stage)، میزان کنترل قند خون (ضعیف: HbA1c>۸، متوسط: بین ۷ و ۸، خوب: کمتر از ۷)، نسبت آلبومین ادرار به کراتینین خون، نسبت VEGF ویتره نسبت به پروتئین آن در فرم ایجاد داده ها ثبت گردید.

اندازه گیری VEGF به روش ایمنو اسی

اندازه گیریVEGF در سطح سرم و مایع ویتروه به روش الیزا (با کیت شرکت R&D systemes ساخت کشور آمریکا، شماره کاتالوگ DVE00) انجام گرفت. ابتدا ۱۰۰ µl میکرولیتر از محلول سنجش (RDW1) به داخل میکروپلیت ها ریخته، سپس ۱۰۰ µl از محلول‌های استاندارد سرم و ویتره به میکروپلیت های مربوطه اضافه شده و دو ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از سه بار شستشو با محلول مخصوص، ۲۰۰ µl کونژوگه اضافه کرده و در دمای اتاق دوباره انکوبه نموده و با سه بار شستشو و اضافه کردن ۲۰۰ µl سوبسترا با سرعت ۲۵ دور در دقیقه و انکوبه شد. در نهایت ۵۰ µl محلول استوپ اضافه کرده و پلیت در طول موج ٤٥٠-٥٧٠ خوانده شد.

اندازه گیری هموگلوبین HBA1c

از بیمارانی که به مدت ۱۲-۸ ساعت ناشتا بودند، ۱۰CC نمونه خون وریدی گرفته شد. اندازه‌گیری میزان گلوکز خون ناشتا (FBS) به روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (کیت شرکت زیست شیمی، تهران، ایران، شماره کاتولوگ ۵۰۵-۱۰) انجام گردید. روش کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) نیز برای اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) با استفاده از سیستم Nycocard (نروژ) مورد استفاده قرار گرفت. به طور خلاصه اساس این روش، استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی با تمایل بالا در فشار پایین همراه با شستشوی گرادیانی جهت جداسازی هموگلوبین گلیکوزیله خون تام همولیزه شده بود. برای اندازه‌گیری HbA1c ، ۵ µl خون تام EDTA دار بر روی یک میلی‌لیتر محلول همولیز کننده اضافه و سپس جذب نوری فراکسیون‌های هموگلوبین، جمع‌آوری شده با حذف مواد زمینه‌ای در طول موج نوری ٤/٥ نانومتر خوانده شد. برای اندازه گیری کراتینین سرم (روش ژافه) و پروتئینوری و آلبومینوری از روش های تشخیصی قابل دسترس (روش های رسوبی) استفاده گردید .جهت اندازه گیری پروتئینوری و آلبومینوری از نمونه ادرار صبحگاهی استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

آنالیز آماری

اطلاعات به دست آمده بصورت میانگین± انحراف معیار (Mean ± SD) و نیز فراوانی و درصد بیان شده اند. برنامه آماری بکار رفته SPSS نسخه ۱۳ است. متغیر های کمی با استفاده از Student T-test (Independent Samples) مقایسه شدند. مقایسه در مورد متغیرهای کیفی(Categorical) توسط Contingency Tables و با استفاده از Chi-Square Test و یا Fisher's Exact Test بر حسب شرایط صورت گرفته است. جهت بررسی همبستگی، از ضریب اسپیرمن استفاده شده است. در تمامی موارد مورد مطالعه، نتایج در صورت دارا بودن P < ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار شناخته شدند.

یافته‌ها

۳۰ بیمار در گروه مورد و ۳۵ بیمار در گروه شاهد بررسی شدند. متوسط سن بیماران گروه مورد ۱۰±۵۶ سال بود. کمترین سن ۳۷ سال و بیشترین سن ۸۳ سال بود. در گروه شاهد پایین ترین سن ۳۵ سال و بیشترین سن ۸۰ سال بود. تفاوت معنی دار آماری از این نظر بین دو گروه وجود نداشت (۵/۹۷– ۵/۲۰–CI: ۹۵٪ ؛ P=۰/۸۹۱). در گروه مورد ۱۹ بیمار مرد و ۱۱ بیمار زن بودند. در گروه شاهد ۲۴ بیمار مرد و ۱۱ بیمار زن بودند. درصد مربوطه در نمودار ۱ نشان داده شده است. تفاوت معنی دار آماری از این نظر بین دو گروه وجود نداشت (۲/۲۱ – ۰/۲۸:CI ۹۵٪، OR=۰/۷۹ ؛ P=۰/۶۵۶). شانزده بیمار (۵۳/۳٪) بیمار سیگاری بودند. تشخیص تمامی بیماران رتینوپاتی دیابتی پرولیفراتیو بود. سایر عوارض دیابت در هیچیک از بیماران مشاهده نگردید. متوسط سطح VEGF ویتره در گروه مورد ۱۰۷/۴۸±۳۸۳/۱۰ pg/ml متوسط سطح VEGF ویتره در گروه شاهد ۱/۸۵±۲۴/۸۱ pg/ml بود. متوسط سطح VEGF ویتره در گروه مورد بطور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود (۵۵۶/۹۱ – ۱۵۹/۶۶:CI ۹۵٪ ؛ P=۰/۰۰۱). متوسط سطح VEGF سرم در گروه مورد ۴۴/۸±۵۱۵/۱۲ pg/ml بود. متوسط سطح VEGF سرم در گروه شاهد ۴۶/۴۱±۳۴۳/۵۸ pg/ml بود). متوسط سطح VEGF خون در گروه مورد بطور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود (۳۰۱/۶۰ – ۴۱/۴۶: ۹۵٪ CI؛ P=۰/۰۱۱)(جدول ۱). متوسط سطح هموگلوبین A1c بیماران گروه مورد ۰/۶۰±۷/۸۵ درصد بود. متوسط پروتئینوری بیماران گروه مورد ۹۷/۹۱±۲۸۴/۴۳ mg/dl بود. متوسط آلبومینوری بیماران گروه مورد ۹۷/۹۱±۲۴۹/۴۳ mg/dl بود. متوسط کراتینین سرم بیماران گروه مورد ۰/۵۰±۱/۳۳ mg/dl بود. متوسط نسبت آلبومین ادرار به کراتینین سرم (Alb/Cr) بیماران گروه مورد ۶۹/۷۰±۱۹۱/۵۳ بود. از نظر مدت شروع بیماری دیابت قندی، ۶ (۲۰٪) کمتر از ۱۰ سال و ۲۴ (۸۰٪) بیشتر از ۱۰ سال بود. از نظر کیفیت کنترل قند خون نتایج زیر حاصل گردید: ۱)کنترل خوب[1] : ۲ مورد، ۲) کنترل متوسط[2] : ۱۳ مورد، ۳) کنترل ضعیف[3] : ۱۵ مورد. از نظر نوع دیابت ، نوع ۱ در ۲ (۶/۷٪) مورد و نوع ۲ در ۲۸ (۹۳/۳٪) مورد مشاهده گردید. از نظر نوع درمان، استفاده از انسولین در ۱۲ (۴۰٪) مورد و درمان دارویی (گلی بن‌کلامايد یا مت فورمین) در ۱۸ (۶۰٪) مورد وجود داشت. پر فشاری خون در ۲۰ مورد (۶۶/۷٪) وجود داشت. از نظر stage نفروپاتی، مرحله خفیف در ۲ مورد (۶/۷٪) ، مرحله متوسط در ۱۷ مورد (۵۶/۷٪) و مرحله شدید در ۱۱ مورد (۳۶/۷٪) مشاهده گردید. از نظر stage رتینوپاتی، مرحله خفیف در ۸ مورد (۲۶/۷٪) ، مرحله متوسط در ۱۴ مورد (۴۶/۷٪) و مرحله شدید در ۸ مورد (۲۶/۷٪) مشاهده گردید. از نظر همبستگی[4] بین سطح VEGF سرم با VEGF ویتره، r=۰/۴۵۳ و P=۰/۰۱۲ بدست آمد. یعنی تغییرات این دو عامل، بطور معنی داری همجهت صورت می گیرد. همبستگی پایین و غیرمعنی داری بین سطح VEGF سرم و سطح هموگلوبین A1c سرم مشاهده شد (r=۰/۱۵۸، P=۰/۴۰۳). همبستگی پایین و غیرمعنی داری بین سطح VEGF ویتره و سطح هموگلوبین A1c سرم مشاهده شد (r=۰/۰۳۹، P=۰/۸۳۷)(جدول ۲).

1 - Good
2 - Moderate
3 - Poor
4 - Correlation

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- میانگین غلظت سرمی و مایع ویتره فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در بیماران مبتلا به رتینوپانی تکثیری دیابتی و غیر دیابتی

VEGF(pg/ml)	(N=نفر ۳۰) PDR	(N=نفر ۳۵) NPDR
مایع ویتره		
کل بیماران†	۳۸۳/۱±۱۰۷/۴۸	۲۴/۸۱±۱/۸۵
مردان†	۳۲۵/۸۱±۱۰۹/۶۶	۲۴/۸±۲/۲۴
زنان†	۴۸۲/۰۶±۲۲۸/۹۷	۲۴/۸۲±۳/۴۹
سرم		
کل بیماران†	۴۴/۸±۵۱۵/۱۲	۴۴/۸±۵۱۵/۱۲
زنان††	۴۸۸/۶۷±۴۸/۲۷	۴۸۸/۶۷±۴۸/۲۷
مردان†	۵۶۰/۸±۱	۲۹۷/۲۵±۷۲/۸۱

* مقادیر± نشانگر Mean± SD است.
† مقادیر P معنی دار بود(P≤۰/۰۵)
†† مقادیر P معنی دار نبود(P ≥۰/۰۵)
PDR بیماران مبتلا به رتینوپاتی تکثیری دیابتی
NPDR بیماران مبتلا به رتینوپاتی تکثیری غیردیابتی
VEGF عامل رشد اندوتلیال عروق

جدول۲- ضریب همبستگی بین فاکتور رشد اندوتلیال عروقی با Alb/Cr, HbA1C و Alb در بیماران رتینوپاتی تکثیری دیابتی

	VEGF ویتره و سرم	VEGF ویتره و HbA1C	VEGF سرم و HbA1C	VEGF سرم وAlb	VEGF سرم وAlb/Cr	VEGF ویتره وAlb	VEGF ویتره وAlb/Cr
P	۰/۰۱۲	۰/۴۰۳	۰/۸۳۷	۰/۴۱۴	۰/۰۱۷	۰/۹۱۷	۰/۸۴۲
r	۰/۴۵۳	۰/۱۵۸	۰/۰۳۹	۰/۱۵۵	۰/۴۳۲	۰/۰۲۰	۰/۰۳۸

VEGF عامل رشد اندوتلیال عروق

جدول ۳- مقایسه سطح VEGF سرمی و ویتره در گروه های مختلف بر اساس شدت کنترل قند خون

	کنترل دیابت		
	ضعیف	متوسط	خوب
VEGFسرمی(pg/ml)	۵۲۴/۶۵±۲۴۷/۴۳	۵۶۷/۲۲±۲۰۷/۷۳	۱۰۵/۰۰±۲۳/۷۵
VEGFویتره(pg/ml)	۲۵۰/۵۳±۴۱۲/۲۱۷	۴۴۱/۷۰±۶۲۴/۲۱	۳۸۳/۱۰±۵۸۸/۶۹

* مقادیر± نشانگر Mean± SD است.
VEGF عامل رشد اندوتلیال عروق

جدول ۴- مقایسه سطح VEGF سرمی و ویتره در گروه های مختلف بر اساس مرحله نفروپاتی

	مرحله نفروپاتی		
	خفیف	متوسط	شدید
VEGFسرمی(pg/ml)	۱۰۵/۰۰±۲۳/۷۵	۵۵۶/۳۵±۲۳۲/۸۵	۵۲۵/۹۷±۲۲۶/۷۰
VEGFویتره(pg/ml)	۹۹۶/۳۵±۱۳۹۱/۰۹	۳۲۴/۲۲±۵۳۶/۶۹	۳۸۳/۱۰±۵۸۸/۶۹

* مقادیر± نشانگر Mean± SD است.
VEGF عامل رشد اندوتلیال عروق

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- مقایسه سطح VEGF سرمی و ویتره در گروه های مختلف بر اساس مرحله رتینوپاتی

	مرحله رتینوپاتی		
	خفیف	متوسط	شدید
VEGFسرمی(pg/ml)	۴۳۹/۸۳±۲۷۲/۹۱	۵۳۳/۷۷±۲۳۲/۳۲	۵۵۷/۷۷±۲۵۶/۵۷
VEGFویتره(pg/ml)	۱۲۵/۴۲±۱۲۴/۷۸	۶۴۸/۵۳±۷۷۵/۶۷	۱۷۶/۲۸±۱۹۲/۶۲

* مقادیر± نشانگر Mean± SD است.

VEGF عامل رشد اندوتلیال عروق

متوسط سطح هموگلوبین A1c سرم در بیماران مصرف کننده انسولین ۷/۸۷±۰/۵۲ درصد و در بیماران مصرف کننده دارو ۷/۸۴±۰/۶۶ درصد بود (۰/۵۰ – ۰/۴۳ :CI ۹۵٪؛ P=۰/۸۹۵). متوسط سطح VEGF خون در بیماران مصرف کننده انسولین، ۱۳۹/۵۱±۶۲۳/۹۴ pg/ml و در بیماران مصرف کننده دارو ۲۷۶/۲۸±۴۴۲/۵۷ pg/ml بود. متوسط سطح VEGF خون در بیماران مصرف کنندگان انسولین بطور معنی داری بیشتر از مصرف کنندگان دارو بود (۳۵۸/۷۴ تا ۳/۹۷ CI: ۹۵٪ ؛ P=۰/۰۴۵). متوسط سطح VEGF ویتره در بیماران مصرف کننده انسولین ۱۶۷/۹۴±۲۶۴/۹۸ pg/ml و در بیماران مصرف کننده دارو ۷۴۶/۰۰±۴۶۱/۸۵ pg/ml بود (۲۵۴/۰۹ – ۶۴۷/۹۳ :CI ۹۵٪؛ P=۰/۳۷۹). در سه گروه بیمار طبقه بندی شده از نظر کیفیت کنترل قند خون، سطح VEGF خون بطور معنی داری در گروه با کنترل خوب کمتر از بقیه بود (P=۰/۰۳۹). متوسط سطوح VEGF خون در این سه گروه در جدول ۳ خلاصه شده است. متوسط سطح VEGF ویتره در سه گروه مذکور تفاوت معنی داری نداشت (P=۰/۲۲۲ ؛ جدول ۳). در سه گروه بیمار طبقه بندی شده از نظر stage نفروپاتی، سطح VEGF سرم بطور معنی داری در گروه با stage[1] کمتر از بقیه بود (P=۰/۰۴۲). متوسط سطوح VEGF سرم در این سه گروه در جدول ۴ خلاصه شده است. متوسط سطح VEGF ویتره در سه گروه مذکور تفاوت معنی داری نداشت (P=۰/۳۱۹؛ جدول ۴). در سه گروه بیمار طبقه بندی شده از نظر stage رتینوپاتی، سطح VEGF سرم در سه گروه تفاوت معنی داری نداشت (P=۰/۶۰۱). متوسط سطوح VEGF سرم در این سه گروه در جدول ۵ خلاصه شده است. متوسط سطح VEGF ویتره نیز در سه گروه مذکور تفاوت معنی داری نداشت (P=۰/۰۶۳؛ جدول ۵). همبستگی پایین و غیرمعنی داری بین سطح VEGF سرم و میزان آلبومینوری مشاهده شد (r=۰/۱۵۵، P=۰/۴۱۴). از نظر همبستگی بین سطح VEGF سرم با میزان Alb/Cr، r=۰/۴۳۲ و p=۰/۰۱۷ بدست آمد. یعنی تغییرات این دو فاکتور به طور معنی داری همجهت صورت می گیرد . همبستگی پایین و غیرمعنی داری بین سطح VEGF ویتره و میزان آلبومینوری مشاهده شد (r=-۰/۰۲۰، P=۰/۹۱۷). همبستگی پایین و غیرمعنی داری بین سطح VEGF ویتره و میزان Alb/Cr مشاهده شد (r=۰/۰۳۸، P=۰/۸۴۲)(جدول ۲). متوسط سطح VEGF سرم در بیماران با سابقه کمتر از ۱۰ سال ابتلا به دیابت ۲۳۷/۷۴±۵۲۵/۸۰ پیکوگرم در میلی لیتر بود. متوسط سطح VEGF سرم در بیماران با سابقه بیشتر از ۱۰ سال ابتلا به دیابت ۲۵۲/۳۹±۵۱۲/۴۵ pg/ml بود. تفاوت معنی دار آماری از این نظر بین دو گروه وجود نداشت (۲۴۶/۹۳ – ۲۲۰/۲۴ :CI ۹۵٪؛ P=۰/۹۰۸). متوسط سطح VEGF ویتره در بیماران با سابقه کمتر از ۱۰ سال دیابت ۱۵۳/۷۶±۸۴/۷۸ pg/ml بود. متوسط سطح VEGF ویتره در بیماران با سابقه بیشتر از ۱۰ سال دیابت ۶۳۴/۶۶±۴۵۷/۶۸ pg/ml بود.

تفاوت VEGF در بیماران با کنترل ضعیف قند خون

متوسط سطح VEGF سرم در بیماران با سابقه کمتر از ۱۰ سال دیابت ۲۰۲/۳۴±۵۸۱/۱۳ pg/ml بود. متوسط سطح VEGF سرم در بیماران با سابقه بیشتر از ۱۰ سال دیابت ۲۶۳/۴۲±۵۱۰/۵۳ pg/ml بود. تفاوت معنی دار آماری از

Archive of SID

www.SID.ir

این نظر بین دو گروه وجود نداشت (۴۲۶/۱۷ – ۲۸۴/۹۷– CI: ۹۵٪؛ p=۰/۶۷۵). متوسط سطح VEGF ویتره در بیماران با سابقه کمتر از ۱۰ سال دیابت ۲۱۰/۳۸±۱۵۵/۱۳ pg/ml بود. متوسط سطح VEGF ویتره در بیماران با سابقه بیشتر از ۱۰ سال دیابت ۴۵۲/۸۹±۲۷۴/۴۰ pg/ml بود. تفاوت معنی دار آماری از این نظر بین دو گروه وجود نداشت (۴۷۲/۹۷ – ۷۱۱/۵۲ CI:–۹۵٪، p=۰/۶۷۱).

تفاوت VEGF در بیماران با کنترل متوسط قند خون

متوسط سطح VEGF سرم در بیماران با سابقه کمتر از ۱۰ سال دیابت ۰/۰±۶۴۴/۸۰ pg/ml. متوسط سطح VEGF سرم در بیماران با سابقه بیشتر از ۱۰ سال دیابت ۲۲۴/۴۱±۵۵۳/۱۱ pg/ml بود. تفاوت معنی دار آماری از این نظر بین دو گروه وجود نداشت (۴۵۳/۶۹ – ۲۷۰/۳۳– CI: ۹۵٪؛ P=۰/۵۸۸). متوسط سطح VEGF ویتره در بیماران با سابقه کمتر از ۱۰ سال دیابت ۰/۰±۱۵/۳۰ pg/ml بود. متوسط سطح VEGF ویتره در بیماران با سابقه بیشتر از ۱۰ سال دیابت ۶۵۱/۶۱±۵۱۹/۲۳ pg/ml بود. تفاوت معنی دار آماری از این نظر بین دو گروه وجود نداشت (۵۴۷/۲۲ – ۱۵۵۵/۱۰–CI: ۹۵٪؛ P=۰/۳۱۴).بعلت تعداد حجم کم نمونه بیماران با کنترل خوب، مقایسه مذکور در این گروه مقدور نگردید. ارتباط معنی دار آماری از این نظر بین دو گروه وجود نداشت (۱۶۸/۳۲ – ۹۱۴/۱۳–CI: ۹۵٪؛ P=۰/۱۶۹).

بحث

ما در این مطالعه به بررسی و مقایسه سطح سرمی و ویتره فاکتور رشد اندوتلیوم عروق (VEGF) در بیماران دچار رتینوپاتی پرولیفراتیو دیابتی و غیر دیابتی پرداختیم. متوسط VEGF سرمی و ویتره در بیماران دچار رتینوپاتی پرولیفراتیو دیابتی (PDR) به ترتیب ۲۴۵/۵۵±۵۱۵/۱۲ و ۵۸۸/۶۹±۳۸۳/۱۰ pg/ml و در بیماران دچار رتینوپاتی پرولیفراتیو غیردیابتی به ترتیب ۲۷۴/۵۵±۳۴۳/۵۸ و ۱۰/۹۷±۲۴/۸۱ pg/ml بود. هر دو میزان سرمی و ویتره VEGF بطور معنی داری در بیماران دیابتی بیشتر بود (p به ترتیب ۰/۰۱۱ و ۰/۰۰۱). Funatsu و همکارانش ۵۷ بیمار PDR را با ۱۶ بیمار شاهد مقایسه نمودند. متوسط سطح VEGF ویتره به ترتیب ۱۱۳۵/۲ و ۱۹/۳ pg/ml بود. این اختلاف از نظر آماری معنی دار گزارش شد[۱۱]. Hernandez و همکاران ۲۰ بیمار PDR را با ۲۰ بیمار شاهد مقایسه نمود. در این مطالعه نیز سطح VEGF ویتره بطور معنی داری در گروه PDR بیشتر بود (۱۳۴ در برابر ۹ pg/ml) ولی تفاوت معنی داری از نظر سطح VEGF سرمی مشاهده نگردید (۱۷۷ در برابر ۱۷۰ pg/ml) [۱۲].

در یک مطالعه مشابه دیگر توسط Malik و همکارانش بر روی ۱۱ بیمار PDR و ۲۳ بیمار شاهد، سطح VEGF ویتره در گروه مورد بیشتر بود (۷۲۰ در برابر ۱۸۰ pg/ml) [۱۳]. در یک بررسی دیگر توسط Hernandez بر روی ۲۳ بیمار PDR و ۱۷ کنترل، سطح VEGF ویتره در بیماران گروه مورد بیشتر بود (۱۴۲ در برابر ۹ pg/ml) ولی تفاوت معنی داری از نظر سطح VEGF سرمی مشاهده نشد (۱۵۰ در برابر ۱۲۰ pg/ml) [۱۴]. در مطالعه Simo بر روی ۳۷ بیمار PDR و ۲۱ کنترل، سطح VEGF ویتره در بیماران گروه مورد بیشتر بود (۱۳۸ در برابر ۹ pg/ml) ولی تفاوت معنی داری از نظر سطح VEGF سرمی مشاهده نشد (۱۳۰ در برابر ۱۶۰ pg/ml) [۱۵]. Watanabe نیز در مطالعه خود بر روی ۴۱ بیمار PDR و ۱۸ غیردیابتی نشان داد که سطح VEGF ویتره در گروه اول بیشتر است (۸۱۲ در برابر ۱۷ pg/ml) [۱۶]. در یک بررسی مشابه توسط Sydorova و همکارانش، هم میزان VEGF سرم و هم سطح VEGF ویتره در بیماران PDR بیشتر از گروه کنترل بود[۱۷]. Hogeboom Van Buggenum و همکارانش ۳۹ بیمار PDR را با ۱۱ بیمار شاهد مقایسه نمودند. متوسط سطح VEGF ویتره به ترتیب ۱۱۳۴ و ۵۰ pg/ml بود. این اختلاف از نظر آماری معنی دار گزارش شد[۱۸].

در یک مطالعه مشابه دیگر توسط Aiello و همکارانش بر روی ۷۰ بیمار PDR و ۲۵ بیمار شاهد، سطح VEGF ویتره در گروه مورد بیشتر بود (۳۶۰ در برابر ۱۰۰ pg/ml) [۱۹]. Deng و همکارانش ۲۷ بیمار PDR را با ۱۴ بیمار شاهد مقایسه نمودند. متوسط سطح VEGF ویتره بترتیب ۴۱۰ و

Archive of SID

www.SID.ir

۱۷ pg/ml بود. این اختلاف از نظر آماری معنی دار گزارش شد [۲۰]. در یک مطالعه توسط Ambati و همکارانش بر روی ۲۲ بیمار PDR و ۲۸ بیمار شاهد، سطح VEGF ویتره در گروه مورد بیشتر بود (۱۷۵۹ در برابر ۲۷ pg/ml) [۲۱]. در مطالعه Zhou بر روی ۱۹ بیمار PDR و ۷ کنترل، سطح VEGF ویتره در بیماران گروه مورد بیشتر بود (۵۶۶ در برابر ۳۵۰ pg/ml) [۲۲]. Adamis نیز نتیجه مشابهی گزارش نموده است [۲۳]. در مطالعه Burgos بر روی ۲۰ بیمار PDR و ۱۳ کنترل، سطح VEGF ویتره در بیماران گروه مورد بیشتر بود (۱۷۵ در برابر ۹ pg/ml) ولی تفاوت معنی داری از نظر سطح VEGF سرمی مشاهده نشد [۲۴]. تقریبا تمامی مطالعاتی که در این زمینه تا کنون انجام شده اند، ذکر گردیدند. همانگونه که ملاحظه می گردد، در تمامی بررسی های انجام شده، سطح VEGF ویتره در بیماران PDR به طور معنی داری بیشتر گزارش شده است. در مورد سطح VEGF سرم نتایج متناقض است و در جمع بندی نتایج سایر مطالعات می توان متوسط سطح VEGF ویتره در بیماران PDR را ۶۲۳ (۱۳۸ تا ۱۷۵۹) pg/ml و متوسط سطح VEGF سرم در بیماران PDR را ۲۳۴ (۱۲۰ تا ۵۰۹) pg/ml در نظر گرفت.

نتایج حاصل از مطالعه ما نیز در محدوده ذکر شده قرار دارد، ولی بایستی توجه کرد که نتایج بررسی فعلی بر اساس میزان پروتئین های ویتره محاسبه شده اند. اینکار جهت رفع عامل مخدوش کننده غلیظ یا رقیق بودن صورت گرفته و در نتیجه نتایج حاصله از دقت بالایی برخوردارند. همین امر یکی از نقاط قوت مطالعه فعلی می باشد.

در مورد سطح VEGF سرمی، Burgos در مطالعه خود نشان داد که رابطه معنی داری بین سطح آن و سطح VEGF ویتره وجود ندارد. وی معتقد است که تمامی VEGF ویتره در داخل چشم ساخته شده و انتشار سرمی آن وجود نداشته و یا ناچیز است [۲۴]. در مطالعه ما همبستگی بالا و معنی داری بین سطح سرمی و ویتره VEGF مشاهده گردید (r=۰/۴۵۳ و P=۰/۰۱۲). همانطور که اشاره شد، سطح VEGF سرمی در مطالعه ما در بیماران PDR بیشتر است. این بر خلاف نتایج گزارش شده مطالعه مذکور است. بهر حال جهت رسیدن به نتایج قطعی در این زمینه، به مطالعات بیشتری نیازمند هستیم. در مطالعه فعلی نشان داده شد که سطح VEGF ویتره با نوع درمان دیابت، نحوه کنترل قند خون، شدت نفروپاتی، طول مدت دیابت، نسبت کراتینین به آلبومین سرم، شدت رتینوپاتی و سطح هموگلوبین A1c رابطه معنی داری ندارد (P>۰/۰۵). تا جایی که ما بررسی نمودیم، مطالعات معدودی در این زمینه صورت گرفته اند: Malik نیز در بررسی خود نشان داد که رابطه معنی داری بین سطح هموگلوبین A1c و VEGF ویتره وجود ندارد[۱۳]. Shinoda در مطالعه دیگری نشان داد که رابطه معنی داری بین سطح VEGF ویتره با نوع و مدت دیابت، نوع رژیم درمانی بکار رفته، سطح هموگلوبین A1c و میزان اختلال عملکرد کلیوی وجود ندارد [۲۵].

در مورد رابطه سطح VEGF ویتره با شدت رتینوپاتی، مطالعات موجود نشان داده اند که سطح این ماده در موارد فعال[1] بیماری بیشتر از حالت خاموش[2] است ولی مطالعه ای مشابه بررسی ما وجود ندارد [۱۱،۱۲،۱۵]. از سوی دیگر در مطالعه ما سطح VEGF سرمی در مصرف کنندگان دارو، کنترل خوب قند خون و مرحله ۱ نفروپاتی دیابتی کمتر بود. همچنین رابطه معنی دار و مثبتی بین سطح این عامل و نسبت کراتینین به آلبومین خون مشاهده گردید. مطالعه مشابهی در این زمینه وجود ندارد. جهت تایید این موارد نیز به بررسی های بیشتری وجود دارد.

به طور خلاصه، متوسط VEGF سرمی و ویتره در بیماران دچار رتینوپاتی نسبت به پرولیفراتیو دیابتی بالاتر و معنی دار بود. همبستگی مثبت و معنی داری بین VEGF سرم و ویتره بیماران وجود داشت. متوسط نسبت آلبومین ادرار به کراتینین سرم VEGF سرم در بیماران تحت درمان دارویی، کنترل خوب قند خون و مرحله خفیف نفروپاتی دیابتی کمتر بود. VEGF سرم و ویتره با شدت رتینوپاتی و طول مدت دیابت رابطه نداشت. همبستگی معنی دار و مثبتی بین VEGF سرم و میزان کراتینین/آلبومینوری وجود داشت. همبستگی معنی داری بین سطح VEGF سرم یا

1 - Active
2 - Quiescent

Archive of SID

www.SID.ir

ویتره با سطح هموگلوبین A1c مشاهده نشد. با توجه به این که سطح VEGF سرم در مقایسه با سطح VEGF ویتره عامل تعیین کننده بهتری برای بهتر وضعیت بیماران دچار رتینوپاتی دیابتی پرولیفراتیو بوده و از سویی اندازه گیری آن راحت تر است، توصیه می شود از عامل سرمی در ارزیابی بیماران استفاده شود. با توجه به تاثیر مثبت کنترل خوب قند خون بر سطح VEGF سرم، بر اهمیت این اقدام در جهت جلوگیری از ایجاد ضایعات چشمی و انجام مطالعات بعدی با حجم نمونه بیشتر توصیه می گردد.

.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از حمایت مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران در جهت تامین اعتبارات این پژوهش و همکاران محترم در بیمارستان چشم نیکو کاری و نیز آزمایشگاه تخصصی و فوق تخصصی پاتوبیولوژی مرکزی دانشگاه علوم پزشکی تبریز برای تمهید مقدمات این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند.

ماخذ

1. Aiello LM, Cavallerano JD, Aiello LP, Bursell SE . Diabetic retinopathy. In: Guyer DR, Yannuzzi LA, Chang S: *Retina Vitreous Macula*, Vol2, 6th ed. 1999 Saunders, USA, 316-344.
2. Akduman L, Olk RJ . The early treatment for diabetic retinopathy study. In: Kertes C: *Clinical Trials in Ophthalmology-A Summary and Practice Guide*, 3rd ed. 1998 Lipincott, USA, 15-36.
3. Liesegang TJ, Skuta GL, Cantor LB . *Retina & vitreous*, 25th ed. 2004 LEO Publication, USA, 100-103.
4. Benson WE, Tasman W, Duane TD . *Duane's Clinical Ophthalmology*. Vol3, 11th ed. 1994 McGraw Hill, 125-146.
5. Bhavsar AR.Diabetic retinopathy: the latest in current management. *Retina* 2006; 26 (6), S71-S79.
6. Federman JL, Gouras P, Schubert. Systemic diseases. In: Podos SM, Yanoff M: *Retina and Vitreous-Textbook of Ophthalmology*, Vol9, 24th ed. H (1994) McGraw Hill, USA, 7-24.
7. Frank RN. Etiologic mechanisms in diabetic retinopathy. In: Ryan SJ: *Retina*, Vol2, 2nd ed. (1994) Lipincott , USA, 1243-1276.
8. Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K. The relationbetween expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab Invest* 1996; 74: 819–825.
9. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. . Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995; 270: 13333–13340.
10. Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med*. 1995; 73: 333–346.
11. Funatsu H, Yamashita H, Nakanishi Y, Hori S. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy.*Br J Ophthalmol* 2002; 86(3): 311-315.
12. Hernandez C, Burgos R, Canton A, Garcia-Arumi J, Segura RM, Simo R. Vitreous levels of vascular cell adhesion molecule and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study. *Diabetes Care* 2001; 24(3): 516-521.
13. Malik RA, Li C, Aziz W, Olson JA, Vohra A, McHardy KC, et al. Elevated plasma CD105 and vitreous VEGF levels in diabetic retinopathy. *J Cell Mol Med* 2005; 9(3): 692-697.
14. Hernandez C, Lecube A, Segura RM, Sararols L, Simo R. Nitric oxide and vascular endothelial growth factor concentrations are increased but not related in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet Med* 2002; 19(8): 655-660.
15. Simo R, Lecube A, Segura RM, Garcia Arumi J, Hernandez C. Free insulin growth factor-I and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2002; 134(3): 376-382.
16. Watanabe D, Suzuma K, Suzuma I, Ohashi H, Ojima T, Kurimoto M, et al. Vitreous levels of angiopoietin 2 and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2005; 139(3): 476-481.
17. Sydorova M, Lee MS. Vascular endothelial growth factor levels in vitreous and serum of patients with either proliferative diabetic retinopathy or proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res* 2005; 37(4): 188-190.

Archive of SID

www.SID.ir

18. Hogeboom van Buggenum IM, Polak BC, Reichert-Thoen JW, de Vries Knoppert WA, van Hinsbergh VW, Tangelder GJ.. Angiotensin converting enzyme inhibiting therapy is associated with lower vitreous vascular endothelial growth factor concentrations in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2002; 45(2): 203-209.
19. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331(22): 1480-1487.
20. Deng J, Wu DZ, Gao R. Elevated vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Yan Ke Xue Bao* 1999; 15(1); 17-21.
21. Ambati J, Chalam KV, Chawla DK, D'Angio CT, Guillet EG, Rose SJ, et al. Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1997; 115(9): 1161-1166.
22. Zhou H, Zhang H. A comparative study of vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 1997; 33(4): 247-250.
23. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, et al.. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994; 118(4): 445-450.
24. Burgos R, Simo R, Audi L, Mateo C, Mesa J, Garcia-Ramirez M, et al.. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are not influenced by its serum concentrations in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 1997; 40(9): 1107-1109.
25. Shinoda K, Ishida S, Kawashima S, Wakabayashi T, Uchita M, Matsuzaki T, et al. Clinical factors related to the aqueous levels of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 2000; 21(2): 655-661.

Archive of SID

www.SID.ir