● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال سوم ، شمارهٔ ۱ (پی‌درپی۹) ، صفحه ۱۴ الی ۲۰ ، زمستان ۱۳۷۹

نقش سیستم نورآدرنرژیک مرکزی در اثر اسیدهای آمینه تحریکی بر ترشح هورمون FSH در رت

سیما شهابی [۱*] ، دکتر علی اکبر مقدم‌نیا [۲]

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- استادیار گروه فیزیولوژی - فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل

سابقه و هدف: اسیدهای آمینه تحریکی از واسطه‌های عصبی مرکزی هستند که دارای اثرات تحریکی بر ترشح گونادوتروپین‌ها در حیوانات ماده و نر می‌باشند. در این مطالعه نقش اسیدهای آمینه تحریکی بر فعالیت نرونهای نورآدرنرژیک مرکزی (NA) مستقر در هسته لوکوس سرلوئوس در ترشح هورمون محرکه فولیکولی (FSH)، بررسی گردید.

مواد و روشها: جهت انجام آزمایشها، از موشهای صحرائی بالغ نر استفاده گردید. ابتدا به روش استریوتاکسی، در هسته لوکوس سرلوئوس یک کانول راهنما نصب شد. پس از گذشت مدت زمان لازم بعد از عمل جراحی به حیوانات کانول‌گذاری شده، گلوتامات به میزان ۲۰ میکروگرم در ۱۰ میکرولیتر در درون هسته لوکوس سرلوئوس تزریق شد. ده دقیقه بعد از تزریق، نمونه خونی از حیوانات تهیه شد. برای بررسی نقش اصلی هسته لوکوس سرلوئوس، تخریب دو طرفه هسته توسط DSP-4 صورت گرفت و بعد از گذشت یک هفته جهت تخریب کامل نرونهای نورآدرنرژیک، گلوتامات را درون هسته، تزریق کرده و بعد از ده دقیقه نمونه خونی تهیه شد. میزان FSH در نمونه سرمی به روش IRMA اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: غلظت FSH بعد از تزریق گلوتامات در مقایسه با میزان آن بعد از تزریق سالین افزایش معنی‌داری نشان داد ($p=۰/۰۲$). تخریب دو طرفه هسته لوکوس سرلوئوس توسط DSP-4 و سپس تزریق گلوتامات در هسته مذکور نیز، کاهش معنی‌داری در میزان این هورمون نسبت به میزان آن در گروهی که فقط گلوتامات دریافت کرده بودند، داشت ($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری : نتایج بدست آمده حاکی از نقش مؤثر سیستم نورآدرنرژیک مرکزی و به ویژه نرونهای خروجی از هسته لوکوس سرلوئوس در وساطت اسیدهای آمینه تحریکی بر ترشح FSH می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *سیستم نورآدرنرژیک مرکزی، هسته لوکوس سرلوئوس، اسیدهای آمینه تحریکی ، هورمون محرکه فولیکولی، رت.*

مقدمه

گزارشات متعدد حاکی از نقش اسیدهای آمینه تحریکی، (Excitatory Amino Acid , EAA) در تنظیم اعمال نوروآندوکرین می‌باشد. بطوریکه نقش اساسی را در تنظیم ترشح گونادوتروپین‌ها، از جمله هورمون محرکه فولیکولی (FSH) دارند (۲و۱). براساس مطالعات انجام شده، محل اثر اسیدهای آمینه تحریکی در تنظیم ترشح گونادوتروپین‌ها در هیپوتالاموس می‌باشد، نه در هیپوفیز. زیرا اولاً تزریق اسیدهای آمینه تحریکی مانند گلوتامات در داخل هیپوفیز اثری بر ترشح هورمونها ندارد (۳)، ثانیاً تزریق اسیدهای آمینه تحریکی مانند گلوتامات در داخل

▣ - هزینهٔ این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره۱۳۷۸۶ از اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تأمین شده است.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.2.7]

بطن مغز موجب تحریک ترشح گونادوتروپین‌ها می‌شود(۴) و ثالثاً تزریق اسیدهای آمینه تحریکی از قبیل آسپارتات و گلوتامات با غلظتهای بالا در هسته‌های مختلف هیپوتالامیک موجب ترشح گونادوتروپین‌ها شده است (۵). بنابراین اسیدهای آمینه تحریکی، نقش خود را در تنظیم ترشح گونادوتروپین‌ها، از طریق تحریک ترشح GnRH ایفا می‌کنند (۶). این اثر خود را بر روی ترشح GnRH در هسته قوسی که محل پایانه‌های اعصاب حاوی GnRH می‌باشد (۷) و منطقه پراپتیک که محل اجسام سلولی اعصاب حاوی GnRH می‌باشد، اعمال می‌نماید (۸). وجود گیرنده‌های اسیدهای آمینه تحریکی بر روی اعصاب حاوی GnRH ممکن است دال بر اثر مستقیم اسیدهای آمینه تحریکی در تحریک این اعصاب و ترشح محتویات آن یعنی GnRH باشد(۹و۵).

لذا در این مطالعه، تلاش برآن است تا با تزریق مستقیم اسیدهای آمینه تحریکی به هسته لوکوس سرلوئوس و اندازه‌گیری میزان هورمون محرکه فولیکولی (FSH) سرم خون، جزئیات ارتباط دو سیستم نورآدرنرژیک مرکزی و اسیدهای آمینه تحریکی در ترشح گونادوتروپین‌ها، هرچه بیشتر روشن شود. همچنین اثر تجویز اسیدهای آمینه تحریکی بر روی ترشح هورمون محرکه فولیکولی (FSH) از طریق سیستم نورآدرنرژیک مرکزی (هسته لوکوس سرلوئوس) بررسی شده که می‌تواند شاخصی بر نقش تنظیم کننده اسیدهای آمینه درون‌زا (endogenous) در ترشح هورمون محرکه فولیکولی باشد.

مواد و روشها

■ **حیوانات:** برای انجام تحقیق از موشهای صحرایی (Rat) نر بالغ از گونه Wistar، در محدوده وزنی ۲۵۰-۱۵۰ گرم استفاده شد.

■ **مواد:** در این آزمایش از پنتوباربیتال سدیم (نمبوتال)، گلوتامات دی سدیم، DSP-4، سیمان مورد استفاده در دندانپزشکی و حلال آن و فرمالدئید استفاده شد.

■ **روش کار:** قبل از انجام آزمون مورد نظر، ابتدا به روش استریوتاکسی، یک کانول راهنما جهت تزریق داروها در هسته لوکوس سرلوئوس بر روی جمجمه حیوان نصب شد. برای این کار، ابتدا حیوانات را با تزریق داخل صفاقی (I.P) پنتوباربیتال سدیم به میزان ۴۵mg/kg، بیهوش کرده و سپس با استفاده از اطلس پاکسینوز کانول راهنما را با مشخصات AP=-۱۰/۰۴ml و L=۱/۵۸ml و DV=۶ml (۱۰) ابتدای هسته قرار داده و بر سطح جمجمه توسط سیمان دندانپزشکی ثابت کردیم (۱۰). تزریق محلولهای دارویی با سرعت ۲ میکرولیتر در ثانیه و توسط یک کانول تزریق که به لوله رابط پلی‌اتیلنی و سرنگ هامیلتون متصل بوده و در درون کانول راهنما قرار می‌گرفت، صورت گرفت. ۱۰ الی ۱۵ دقیقه بعد از تزریق دارو به هسته، خونگیری از گوشه چشم حیوان صورت می‌گرفت (۱۱) و سپس سرم از طریق سانتریفوژ نمونه‌های بدست آمده با ۳۰۰۰ دور در دقیقه تهیه نموده و تا زمان استفاده برای تعیین مقدار هورمون محرکه فولیکولی در سرمای ۲۰- درجه سانتیگراد، نگهداری می‌کردیم.

به منظور تخریب شیمیایی هسته لوکوس سرلوئوس از نوروتوکسین انتخابی اعصاب نورآدرنرژیک که DSP-4 می‌باشد، استفاده شد. این توکسین در حین عمل جراحی استریوتاکسی توسط سرنگ هامیلتون به درون هر دو هسته لوکوس سرلوئوس تزریق می‌شد و بعد از گذشت یک هفته به منظور تخریب کامل سیستم نورآدرنرژیک، گلوتامات به درون کانول راهنما تزریق شده و خونگیری صورت می‌گرفت.

به منظور تعیین صحت کانول گذاری بعد از اتمام هر آزمون ماده قرمز خنثی (Neutral red) به میزان ۲ میکرولیتر توسط سرنگ هامیلتون در هسته لوکوس سرلوئوس تزریق و پس از کشتن حیوان توسط اتر و جداکردن سر، بافت مغز از درون جمجمه بیرون آورده و به مدت یک هفته در فرمالدئید ۱۰٪ قرار داده شد. برشهای بافتی از بافت ثابت شده مغز، تهیه و محل تزریق رنگ در

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.2.7]

زیر میکروسکوپ ردیابی می‌شد. نتایج بدست آمده از آزمایشاتی که در آنها کانول راهنما به طرز صحیح در هسته لوکوس سرلوئوس قرار نگرفته بود، حذف می‌شد. غلظت هورمون محرکه فولیکولی در سرمهای فریز شده با استفاده از کیت آزمایشگاهی FSH-IRMA I125 و با حساسیت ۰/۱ IU/L به روش IRMA اندازه‌گیری شد.

در این مطالعه گروههای آزمایشی از حیوانات در نظر گرفته شده به ترتیب ذیل می‌باشند:

■ **گروه نرمال:** گروهی که هیچ عمل جراحی بر روی آنها صورت نگرفته‌است، از این گروه خونگیری انجام و میزان هورمون محرکه فولیکولی در سرم آنها اندازه‌گیری شد.

■ **گروه کنترل:** در این گروه موشهای کانول‌گذاری شده بعد از بهبودی از جراحی انتخاب می‌شدند. سپس سالین به میزان ده میکرولیتر به درون کانول آنها تزریق شده و بعد از ده دقیقه خونگیری انجام می‌گرفت. میزان هورمون محرکه فولیکولی در سرم خون آنها اندازه‌گیری می‌شد.

■ **گروه گلوتامات:** در این گروه موشهای کانول‌گذاری شده بعد از بهبودی‌از جراحی انتخاب می‌شدند و سپس گلوتامات به میزان ۲۰ میکروگرم در ۱۰ میکرولیتر توسط سرنگ هامیلتون و رابط پلی‌اتیلنی مرتبط با کانول تزریقی به درون هسته لوکوس سرلوئوس از طریق کانول هدایتی تزریق می‌شد و بعد از ده دقیقه خونگیری انجام می‌گرفت و میزان هورمون محرکه‌فولیکولی سرم‌اندازه‌گیری می‌شد.

■ **گروه گلوتامات DSP-4:** در این گروه ابتدا به روش استریوتاکسی، DSP-4 که یک نوروتوکسین انتخابی نرونهای نورآدرنرژیک می‌باشد را به میزان ۵۰ میکروگرم در ۱ میکرولیتر، بوسیله سرنگ هامیلتون ۵ تا ۷ روز به منظور تخریب کامل نرونهای نورآدرنرژیک، گلوتامات به میزان ۲۰ میکروگرم در ۱۰ میکرولیتر به هسته لوکوس سرلوئوس ازطریق کانول راهنما تزریق کردیم و بعد از ۱۰ دقیقه خونگیری صورت گرفت و میزان FSH سرم اندازه‌گیری شد.

■ **آنالیز آماری:** برای مقایسه گروههای آزمایش از تست ANOVA یکطرفه و سپس تست Newman-Keuls استفاده شد. اختلاف در داده‌ها با $p<0/05$ معنی‌دار تلقی شد.

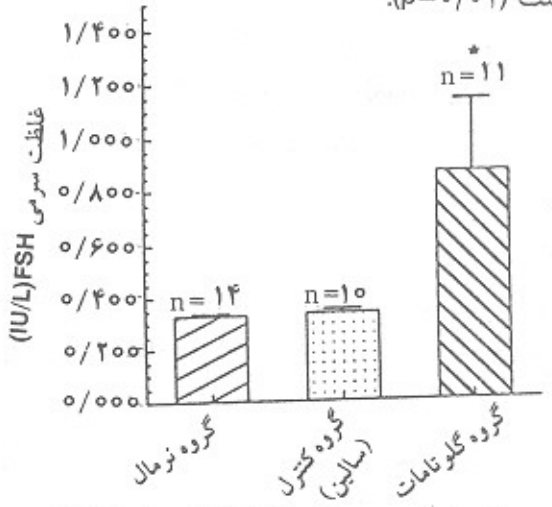
یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصل غلظت سرمی هورمون محرکه فولیکولی در موش بالغ نر، در محدودهٔ ۰/۴ IU/L–۰/۲۶ بود (جدول ۱).

جدول ۱. تغییرات غلظت سرمی FSH در گروههای مختلف مورد بررسی موش‌های صحرائی

گروههای موردآزمایش	غلظت سرمی FSH(IU/L)
نرمال (n=۱۴)	۰/۳۲۷۹ ±۰/۰۱۱
سالین (کنترل) (n=۱۰)	۰/۳۳۸۰ ±۰/۰۱۶
گروه Glu (n=۱۱)	۰/۸۶۲۷ ±۰/۲۷
گروه Glu & DSP-4 (n=۹)	۰/۳۲۱۱ ±۰/۰۰۸

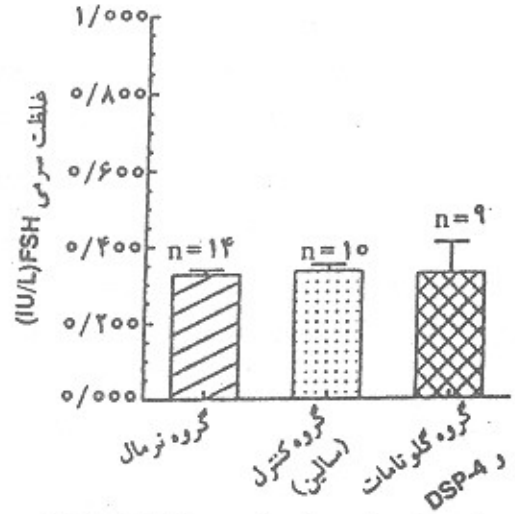
تزریق گلوتامات در داخل هسته لوکوس سرلوئوس موجب افزایش ترشح هورمون FSH گردید (نمودار ۱) به‌گونه‌ای که غلظت سرمی هورمون در این حالت در مقایسه با گروه نرمال و گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت ($p=0/02$).



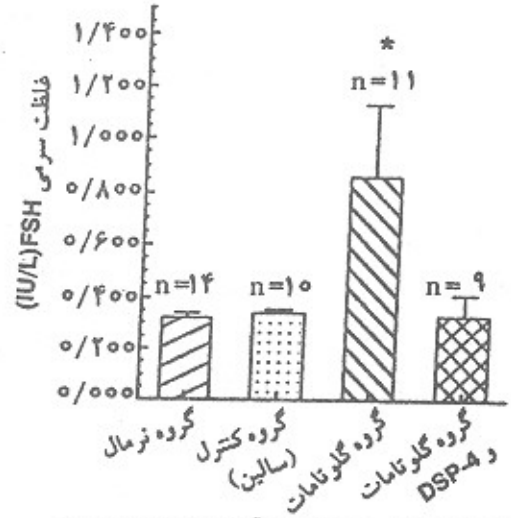
نمودار ۱. بررسی تزریق گلوتامات در هسته L.C بر میزان FSH سرم

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.2.7]

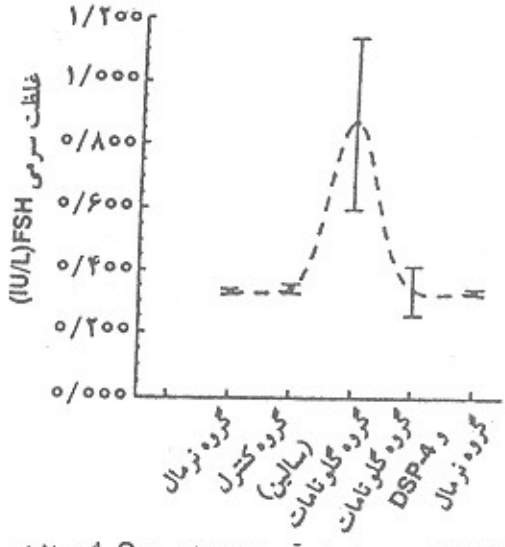
نمودار ۲ عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میزان هورمون FSH خون در گروهی که هسته، تخریب شیمیایی شده با گروه کنترل و گروه نرمال را نشان می‌دهد. پس از ۷ روز قرار گرفتن اعصاب نورآدرنرژیک هسته لوکوس سرلوئوس در معرض نوروتوکسین DSP-4، این هسته تخریب شد که موجب حذف کامل اثر تحریکی دی‌سدیم گلوتامات بر ترشح FSH گردید (نمودار ۳ و نمودار۴).



نمودار۲. تاثیر تخریب شیمیایی سیستم نورآدرنرژیک هسته LC با DSP-4 در جلوگیری از اثرات تحریکی گلوتامات در این ناحیه بر غلظت سرمی FSH



نمودار ۳. نقش سیستم نورآدرنژیک هسته لوکوس سرلوئوس براثرات گلوتامات در ترشح FSH از طریق این هسته



نمودار ۴. نقش سیستم نورآدرنرژیک (هسته LC) بر اثرات تحریکی گلوتامات در ترشح FSH از طریق این هسته

بحث

گزارشاتی مبنی بر نقش اسیدهای آمینه تحریکی درتحریک ترشح گونادوتروپین‌ها (۱۲) از طریق تحریک ترشح GnRH (۱۴و۱۳) در مناطق میانی هیپوتالاموس و منطقه پراپتیک و هسته قوسی از هیپوتالاموس ارائه شده است (۱۲).

وجود گیرنده‌های اسیدهای آمینه تحریکی در روی اعصاب حاوی GnRH نیز حاکی از دخالت اسیدهای آمینه تحریکی GnRH و همچنین ترشح گونادوتروپین‌ها می‌باشد(۱۴). بطوریکه حساسیت منطقه پراپتیک (محل جسم سلولی نرونهای حاوی GnRH)به NMDA[1] که نوعی اسید آمینه‌تحریکی می‌باشدو حساسیت منطقه برجستگی میانی و هسته قوسی (محل پایانه‌های نرونهای حاوی GnRH) به آگونیستهای غیرNMDA که‌نوعی دیگر از اسیدهای‌آمینه تحریکی هستند، مشاهده شده‌است (۱۵).

علی‌رغم وجود ارتباط مستقیم بین اثر اسیدهای آمینه تحریکی و سلولهای GnRH، مطالعات دیگری نیز دال بر وجود ارتباط غیرمستقیم بین اثر اسیدهای آمینه تحریکی

1- N-methy - D,L - asparticacid

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.2.7]

و تحریک سلولهای GnRH در هیپوتالاموس وجود دارد.بطوریکه مطالعات انجام شده بر روی موشهای بالغ نر و ماده علاوه براینکه اثر فعالیت C-Fos (C-Fos ژن تولید کننده پروتئین FOS می‌باشد که به عنوان ردیابهای سلولی برای فعالیت عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد)، متأثر از NMDA را در مناطق هسته قوسی، برجستگی میانی، OVLT[1]، که محل جسم سلولی نرونهای حاوی GnRH می‌باشند را نشان داده‌اند، این اثر در مناطق دیگری مانند کورتکس مغز و همچنین در هسته لوکوس سرلوئوس که به عنوان جایگاه اصلی سیستم نورآدرنرژیک‌مرکزی می‌باشد،نیزمشاهده‌شده‌است(۱۵).

این مطالعات روشنگر اثرات اسیدهای آمینه تحریکی در نقاط مختلف CNS، در داخل هیپوتالاموس بر روی ترشح گونادوتروپین‌ها، بالاخص هورمون محرکه فولیکولی می‌باشند.

بررسی این مطالعات و همچنین وجود ارتباط آناتومیکی بین هسته لوکوس سرلوئوس و برجستگی میانی و مناطق دیگر هیپوتالاموس (۱۵)، این تصور را پیش می‌آورد که اسیدهای آمینه تحریکی ممکن است از طریق سیستم نورآدرنرژیک هسته لوکوس سرلوئوس بر ترشح هورمون محرکه فولیکولی تأثیر بگذارند. بررسی صحت این موضوع در موش صحرایی از اهداف اصلی این تحقیق بوده است. بر اساس نتایج بدست آمده در گروه نرمال غلظت سرمی هورمون محرکه فولیکولی در محدوده ۰/۲۶-۰/۴ IU/L بوده است.

گلوتامات به عنوان یکی از واسطه‌های عصبی شناخته شده که بیشتر از بقیه اسیدهای آمینه تحریکی در بافت مغز یافت شده (۱۶) به عنوان یک مداخله‌گر تنظیمی در سیستم نورواندوکرین مشخص شده است (۵).

نتایج حاصله در این تحقیق بعد از تزریق گلوتامات به هسته لوکوس سرلوئوس در موش صحرائی نر افزایش معنی‌دار در میزان هورمون محرکه فولیکولی در سرم خون را نشان می‌دهد (p=۰/۰۲) که بیانگر اثر تحریکی این اسید آمینه تحریکی بر روی ترشح هورمون محرکه فولیکولی از طریق سیستم عصب‌دهی هسته لوکوس سرلوئوس که جایگاه اصلی سیستم نورآدرنرژیک مرکزی است، می‌باشد.

این مطلب همچنین بیانگر آن است که تنظیم ترشح هورمون محرکه فولیکولی، نه فقط از طریق مناطق هیپوتالاموسی بلکه از طریق مناطق خارج هیپوتالاموسی نیز می‌باشد.

بنابراین این امکان وجود دارد که با تحریک هسته لوکوس سرلوئوس از طریق گلوتامات، اعصاب خروجی از هسته لوکوس سرلوئوس که به طرف هیپوتالاموس می‌روند و ترشح توأم (colocalization) نوراپی‌نفرین گلوتامات را بر روی هیپوتالاموس به همراه دارند(۱) موجب تحریک نرونهای حاوی GnRH در هیپوتالاموس شده و در نتیجه موجب افزایش ترشح هورمون محرکه فولیکولی شده است. همچنین تأثیر DSP-4 که یک نوروتوکسین اختصاصی برای سیستم نورآدرنرژیک می‌باشد و در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته است، در کاهش معنی‌دار (p=۰/۰۲) میزان هورمون FSH سرم حیوانات مورد آزمایش، نیز نقش بارز این هسته را در تنظیم سیستم نوروآندوکرین مشخص کرده بطوریکه اثر تحریکی گلوتامات بر ترشح هورمون محرکه فولیکولی بعد از تخریب این هسته، حذف شد. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که :

۱ـ هسته لوکوس سرلوئوس یکی از مناطق مهم در تنظیم ترشح GnRH و FSH می‌باشد و می‌توان بعنوان یک هسته مرکزی درکنترل ترشح گونادوتروپین‌ها از آن نام برد.

۲ـ اسیدهای آمینه تحریکی بخشی از اثرات خود را برای تحریک ترشح هورمون محرکه فولیکولی از طریق سیستم نورآدرنرژیک مرکزی موجود، در هسته لوکوس سرلوئوس، اعمال می‌نماید.

1- Orgaum Vasculosum of the Lamina Terminalis

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.2.7]

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از زحمات خانم دکتر شهربانو عریان استاد دانشگاه تربیت معلم بخاطر همکاری صمیمانه و زحمات آقای قلی‌اسداله‌زاده متصدی آزمایشگاه و آقای فرامرز کردنائیچ و خانم فاطمه پاکزاد و همچنین معاونت امور پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل به دلیل تأمین اعتبار این طرح تحقیقاتی تقدیر و تشکر می‌شود.

****

References

1. Saitoh Y, Silverman AJ, Gibson MJ. Norepinephrine neuronse in mouse locus coeruleus express c-fos protein after N- Methyl D,L - Aspartic Acid (NMDA) treatment. Brain Res 1991; 561: 11-19.

2. Honaramooz A, Cook SJ, Beard AP, Bartiewsk PM, Rawllings NC. Nitric oxide regulation of gonadotropin secretion in prepubertal heifersl. J Neuroendocrinol 1999; 11(9): 667-76.

3. Blandina P, Johnson D, Walcott J, Goldfrab J. Release of endogenous norepinephrine from rat hypothalamus by stimulation of N-Methyl D,L Aspartic Acid receptors. J Pharmacol Exp Ther 1992; 263(1): 61-68.

4. Lopez FJ, Donso AO, Negero - Villar A. Endogenous excitatory amino acid neurotransmission regulates the estradiol - induced LH surge in ovariectomized rats. Endocrinol 1990; 126(3): 1771-1773.

5. Lopez FJ, Donso AO, Negero - Villar A. Endogenous excitatory amino acids and glutamate receptor subtypes involved in the control of hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone secretion. Endocrinol 1992; 130 (4): 1986-1992.

6. Bettendorf M, De-Zegher F, Albers N, Hart CS, Kaplan SL, Grumbach MM. Acute N- Methyl D, L - Aspartate administration stimulates the luteinizing hormone pulse generator in the ovine fetus. Horm Res 1999; 51(1): 25-30.

7. Scacchi P, Carbone S, Szwarcfarb B, Wuttke W, Moguilevsky JA. Interaction between gabaergic and serotonergic systems with excitatory amino acid neurotransmission in the hypothalamic control of gonadotropin secretion in prepubertal female rats. Brain Res Dev Brain Res 1998; 105(1): 51-8.

8. Minegishist KH, Tano M, Kameda T, Hirakawa T, Miyamoto K. Control of FSH receptor mRNA expression in rat granulosa cells by 3,5 - cyclic adenosine monophosphate, activin, and follistain. Mol Cell Endocrinol 1999; 149 (1-2): 71-77.

9. Brann DW, Mahesh VB. Endogenous excitatory amino acid involvement in the preovulatory and steroid induced surge of gonadotropins in the female rat. Endocrinol 1991; 128(3): 1541-1547.

10. Rodriguez MG. Blockade of the establishment of the sexual inhibition resulting from sexual exhaustion by the coolidge effect. Behav Brain Res 1999; 100(1-2): 25-54.

11. Paxinose G. The rat nervous system. Vol 1 and 2, Academic Press, Australia 1985; 56.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.2.7]

12. Stone SH. Method for obtaining venius blood from the orbital sinus of the rat or mouse. Science 1954; 100-119

13. Pinillal T, Sempere M, Aguilar E. Role of excitatory amino acid pathways in control of gonadotropin secretion in adult female rats sterillized by neonatal administration of estradiol or testosterone. J Reprod Fertill 1998; 113(1): 53-9.

14. Mahesh VB, Brann DW. Neuroendocrine mechanisms underlying the control of gonadotropin secretion by steroid. Steroids 1998; 63(5-6): 253-259.

15. Brann DW, Mahesh VB. Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. Front Neuroendocrinol 1994; 15(1): 3-49.

16. Eonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. J Neurochem 1984; 42(1): 1-11.

* آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی بابل -گروه فیزیولوژی-فارماکولوژی، تلفن: ۵-۲۲۲۹۵۹۱.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.2.7]