

بررسی اثر عصاره برگ درخت گلابی وحشی (تلکا) بر غلظت گلوکز سرم، فعالیت آنتی اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی در موش صحرایی نر

نازنین قلی زاده^۱، زهرا خان باباپور^۱، فرزانه حبیب نژاد^۱، مصطفی لکزائی^۲، مهدی پورامیر^{۳*}

۱- دانش آموز مرکز پرورش استعدادهای درخشان (دبیرستان فرزائگان) بابل

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی بابل

۳- دانشیار گروه بیوشیمی و بیوفیزیک و عضو مرکز تحقیقات سلولی - مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بابل

دریافت: ۸۸/۲/۲۵، اصلاح: ۸۸/۴/۲۴، پذیرش: ۸۸/۷/۸

خلاصه

سابقه و هدف: عصاره برگ گیاه تلکا دارای خصوصیات بیولوژیک فراوانی نظیر آنتی اکسیدان، ضد لارو، ضد باکتری و ضد قارچ در محیط آزمایشگاه می باشد. این مطالعه جهت بررسی اثرات آنتی اکسیدانی، ضد افزایش قند خون و ضد پراکسیداسیون لیپیدی عصاره برگ گیاه تلکا در رت های نر مال انجام شد.

مواد و روشها: این مطالعه تجربی بر روی ۵۶ سر موش نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۱۵۰-۲۰۰ گرم که به هفت گروه هشت تایی کنترل و آزمایش تقسیم شده بودند، انجام شد. از گروه شاهد در ابتدای تحقیق نمونه گیری به عمل آمد. به گروههای آزمایش عصاره برگ گیاه تلکا (۵۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن) برای ۷، ۱۴، ۲۱ روز (یک روز در میان) خورانده شد. به گروههای کنترل نیز آب به میزان ۱/۵ سی سی خورانده شد. بررسی اثر این عصاره بر روی قند خون در سرم بوسیله روش گلوکز اکسیداز و اثرات آنتی اکسیدانی و ضد پراکسیداسیون لیپیدی در سرم و بافتها انجام شد. فعالیت آنتی اکسیدانی به وسیله روش FRAP (ferric reducing antioxidant power) و پراکسیداسیون لیپیدی بوسیله روش TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) اندازه گیری شد.

یافته ها: بعد از ۱۴ روز از شروع تحقیق غلظت گلوکز سرم در گروه آزمایش ($55/61 \pm 8/73$ میلی گرم به ازای هر دسی لیتر) بود که نسبت به گروه شاهد ($99/51 \pm 14/36$ میلی گرم به ازای هر دسی لیتر) کاهش معنی داری داشت ($P=0/032$). تغییرات گلوکز در سایر روزها و بین گروههای کنترل و آزمایش معنی دار نبود. فعالیت آنتی اکسیدانی در بافتها و سرم بعد از ۲۱ روز در گروه آزمایش (کبد: $1178 \pm 43/2$ ، کلیه: $1031/9 \pm 53/4$ ، پانکراس: $164/6 \pm 7/6$ ، سرم: $1986 \pm 182/2$ میکرومولار) نسبت به گروه کنترل (کبد: $33/1 \pm 4/5$ ، کلیه: $544/63 \pm 35/2$ ، پانکراس: $89/8 \pm 8/8$ ، سرم: 1505 ± 89 میکرومولار) افزایش پیدا کرد. اما میزان پراکسیداسیون لیپیدی در بافت ها تغییری نکرد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که عصاره برگ گیاه تلکا دارای فعالیت آنتی اکسیدانی در محیط *in vivo* در سرم و بافت های کبد، کلیه و پانکراس در رت های نر مال است.

واژه های کلیدی: برگ درخت تلکا، آنتی اکسیدان، پراکسیداسیون لیپیدی، قندخون.

مقدمه

کند است که این انتها در برگ های جوان کمی کشیده است. میوه آن کوچک، گرد و کمی گلابی شکل است. برگ این گیاه حاوی مقادیری از یک فنول گلیکوزید به نام آربوتین می باشد (۱). آربوتین (hydroquinone-β-D-glucopyranoside) دارای منشا گیاهی می باشد و در برگ، پوست درخت و

درخت تلکا با نام علمی *Pyrus brossieriana Buhse* که به گلابی وحشی نیز موسوم است، در جنگل های شمال ایران، از ارسباران و آستارا تا گرگان پراکنده است و در ارتفاعات مختلف رشد می کند. این گیاه جزء خانواده Rosaceae می باشد، ارتفاع آن ۵ متر و دارای برگ تخم مرغی گرد با انتهای

* مسئول مقاله:

آدرس: بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک

e-mail: pouramir@yahoo.com

حیوانات گروه آزمایش نیز به همین ترتیب عصاره متانولی برگ درخت تلکا با دوز ۵۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم (یک روز در میان) خوراندند. بعد از این مرحله در روزهای ۷ و ۱۴ از حیوانات خونگیری به عمل آمد و در روز ۲۱ علاوه بر خونگیری، کبد، پانکراس و کلیه حیوانات نیز برای انجام آزمایشات جدا گردید.

تست های بیوشیمیایی: بر روی نمونه های سرم آزمایشات اندازه گیری گلوکز با روش گلوکز اکسیداز (کیت پارس آزمون) و FRAP (ferric reducing antioxidant power) و بر روی نمونه های بافتی آزمایشات FRAP و TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) انجام شد.

سنجش FRAP: روش Strain و Benzie جهت سنجش مورد استفاده قرار گرفت (۶). معرف Frap حاوی ۲/۵ میلی لیتر از یک محلول ۱۰ میلی مولار TPTZ [2,4,6-tripyridyl-s-triazine] شرکت Sigma در ۴۰ میلی مولار HCl به اضافه ۲/۵ میلی لیتر از FeCl₃ و ۲/۵ میلی لیتر از بافر استات ۰/۳ مولار با pH=۳/۶ بطور تازه آماده و به دمای ۳۷ درجه سانتیگراد رسانده شد. مقادیر FRAP با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل Jenway) و مقایسه تغییرات جذب نوری در ۵۹۳ نانومتر بین نمونه تحت آزمایش و استاندارد که حاوی یونهای فرو در مقادیر مشخص می باشد، محاسبه گردید. استاندارد مورد استفاده شامل FeSO₄ و در غلظتهای مختلف (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵) μM بود.

اندازه گیری TBARS: معرف TBARS شامل تری کلرواستیک اسید (۱۵ درصد w/v) - اسید تیوباربیتوریک (۰/۳۷۵ درصد w/v) شرکت Merck و اسید هیدروکلریک ۰/۲۵ نرمال می باشد (۷). برای اندازه گیری TBARS یک سی سی از سرم با ۲ سی سی معرف مخلوط شده و برای ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. سپس برای ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و جذب نوری در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد. داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست Tukey تجزیه و تحلیل و $p < ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

بعد از ۱۴ روز از شروع تحقیق غلظت گلوکز سرم در گروه آزمایش $55/6 \pm 8/7$ میلی گرم بر دسی لیتر) نسبت به گروه شاهد $99/51 \pm 14/36$ میلی گرم بر دسی لیتر) کاهش معنی داری داشت ($p = ۰/۰۳۲$). تغییرات گلوکز در سایر روزها و بین گروههای کنترل و آزمایش معنی دار نبود (نمودار ۱). فعالیت آنتی اکسیدانی توتال سرم در گروه های کنترل با افزایش زمان زیاد شد ولی در روز ۲۱ مقدار آن در گروه آزمایش $1986 \pm 182/2$ میکرومولار) بیشتر از گروه کنترل 1505 ± 89 میکرومولار) بود ($p = ۰/۰۳۳$) (نمودار ۲). فعالیت آنتی اکسیدانی توتال در بافتهای کبد، کلیه و پانکراس در گروه آزمایش (کبد: $1178 \pm 43/21$ ، کلیه: $1031/9 \pm 52/4$ ، پانکراس: $164/6 \pm 7/6$ میکرومولار) نسبت به گروه کنترل (کبد: $33 \pm 4/5$ ، کلیه: $544/6 \pm 35/2$ ، پانکراس: $89/8 \pm 8/8$ میکرومولار) افزایش معنی داری داشت (به ترتیب $p = ۰/۰۰۰$ ، $p = ۰/۰۰۳$ و $p = ۰/۰۰۱$) که بیشترین افزایش در کبد مشاهده گردید (نمودار ۳). میزان TBARS در دو گروه کنترل و آزمایش در تمامی بافتها تفاوت معنی داری نداشت (نمودار ۴).

میوه برخی گیاهان از خانواده Rosaceae مقادیر قابل ملاحظه ای از این ماده وجود دارد (۲). آربوتین در این گیاهان در مقابل برخی بیماریهای باکتریایی نقش محافظتی دارد، که احتمالاً این فعالیت باکتری کشی مربوط به هیدروکینون ها می باشد، که در اثر فعالیت آنزیم بتا-گلوکوزیداز از آربوتین حاصل می شود (۳). تحقیقات نشان می دهد که عصاره برگ گیاه تلکا دارای اثرات ضد قارچ، آنتی اکسیدان، ضد لارو و ضد باکتری می باشد (۴).

دیابت بیماری است که با افزایش قند خون و کاهش ترشح انسولین مشخص می شود. مصرف گیاهان دارویی برای درمان دیابت به خصوص زمانی که داروهای رایج قادر به کنترل بیماری نیستند و بیمار نیاز به تجویز انسولین دارد، چشمگیر می باشد (۵). برای معرفی علمی و کاربردی یک داروی صنعتی یا سنتی جهت پیشگیری و درمان بیماری لازم است آزمایشهای مختلف و متعددی در زمینه های بیوشیمیایی، میکروبیولوژی و... انجام شود تا اثرات مفید، مقدار داروی مصرفی در روز و اثرات نامطلوب آن مشخص شود. این تحقیق جهت مشخص نمودن اثر عصاره برگ گیاه تلکا بر غلظت گلوکز سرم و فعالیت آنتی اکسیدانی سرم و همچنین میزان پراکسیداسیون لیپیدها و میزان آنتی اکسیدان تام در کبد، کلیه و پانکراس در جمعیت نرمال موش صحرایی نر در طی ۲۱ روز انجام شد.

مواد و روشها

این مطالعه تجربی بر روی ۵۶ سر موش نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۱۵۰-۲۰۰ گرم که به هفت گروه هشت تایی کنترل و آزمایش تقسیم شده بودند، انجام شد.

الف) تهیه گیاه و تایید علمی: در تیر ماه ۱۳۸۷ برگ های درخت تلکا از جنگل های حومه شهرستان بابل (بندی غربی) جمع آوری و به تایید مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران رسید.

ب) روش تهیه عصاره: پس از جمع آوری، برگ گیاه در فضای تاریک و به دور از نور خورشید در طی چند روز خشک و سپس به صورت پودر در آمد. ۵۰۰ گرم از پودر حاصله با ۲۵۰۰ سی سی متانول ۶۰ در صد مخلوط گردید و بعد از ۳۶ ساعت مخلوط کردن بر روی دستگاه shaker در دمای آزمایشگاه، عصاره بوسیله دستگاه سانتریفیوژ (مدل Clements 2000) و از کاغذ صافی عبور داده شد. بعد از این مرحله عصاره حاصله در دستگاه rotary evaporator (مدل IKA-Werke) تغلیظ گردید.

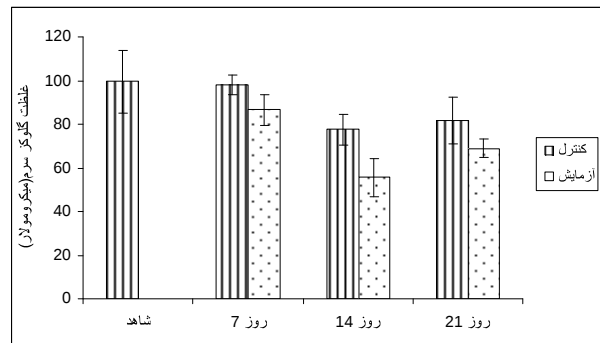
ج) حیوانات آزمایشگاهی: ۵۶ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۵۰-۲۰۰ گرم از انستیتو پاستور تهران خریداری و به مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه علوم پزشکی بابل منتقل و به مدت یک هفته برای تطبیق با شرایط محیط با دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد در این مرکز نگهداری شد. سپس به صورت تصادفی به ۷ گروه ۸ تایی شامل گروه شاهد (زمان شروع تحقیق یا زمان صفر)، گروههای کنترل و آزمایش در زمان های ۷، ۱۴ و ۲۱ روز دسته بندی شدند. حیوانات گروه شاهد در روز شروع تحقیق با اثر بیهوش شده و از آنها خونگیری به عمل آمد و سرم آنها برای انجام آزمایشات جدا شد. به حیوانات گروه کنترل با توجه به گروه مربوطه (۷، ۱۴، ۲۱ روز) با فاصله یک روز در میان آب شهری با لوله مخصوص خوراندند. به

بحث و نتیجه گیری

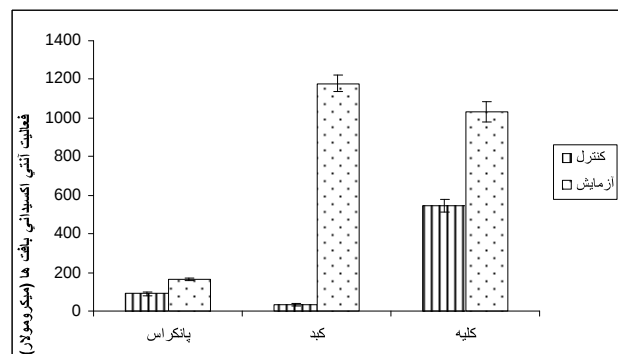
نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره برگ گیاه تلکا با گذشت ۲۱ روز سبب افزایش آنتی اکسیدان تام سرم و بافت های کبد، کلیه و پانکراس می شود. همچنین این تحقیق نشان داد که پراکسیداسیون لیپیدی در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل تفاوتی ندارد.

در تحقیقی که توسط Azadbakht و همکاران در مورد اثرات بیولوژیک عصاره برگ گیاه تلکا انجام شد مشخص گردید که این عصاره دارای خواص ضد باکتری، ضد قارچی، ضد لاروی، آنتی کولین استراز و آنتی اکسیدان می باشد. این محققین برای بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره از روش DPPH در محیط آزمایشگاهی استفاده کردند (۴) ولی در تحقیق حاضر اثرات آنتی اکسیدانی عصاره برگ این گیاه بعد از ۲۱ روز در سرم و همچنین در بافت های کبد، کلیه و پانکراس حیوانات آزمایشگاهی مشخص شد. تعدادی از گیاهان با داشتن مقادیر مختلف از مواد فعال سبب کاهش قند خون می شوند و قادرند از عوارض حاصل از افزایش قند خون جلوگیری کنند (۵). در این مطالعه گلوکز سرم در روز ۱۴ در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد ولی این تغییر نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود. به علت حضور آنتی اکسیدان ها در عصاره برگ این گیاه، میزان آنتی اکسیدان تام سرم در روز ۲۱ در گروهی که عصاره دریافت می کردند نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد و همچنین میزان آنتی اکسیدان تام در بافت ها نیز در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. بیشترین میزان افزایش آنتی اکسیدان در کبد مشاهده شد که احتمالا نشان دهنده ورود و ذخیره این عصاره در کبد و متابولیسم شدن این عصاره در کبد و سلول های کبدی می باشد. در مقایسه با پانکراس آنتی اکسیدان توتال در کلیه افزایش بیشتری داشت که ممکن است به دلیل ورود اجزاء عصاره بخصوص آربوتین به سلول های کلیوی باشد و همچنین کمترین میزان آنتی اکسیدان در پانکراس مشاهده شد که این امر می تواند نشان دهنده دفاع ضعیف آنتی اکسیدانی پانکراس در مقابل استرس های اکسیداتیو و رادیکال های آزاد باشد. Robertson و همکاران مشخص کردند که پانکراس در بین بافت ها دارای کمترین سطح آنتی اکسیدان می باشد و آنزیم های آنتی اکسیدان نظیر سوپر اکسید دسموتاز در این بافت کمتر وجود دارد و احتمالا به همین علت است که پانکراس در مقابل استرس هاس اکسیداتیو حساس تر است (۸).

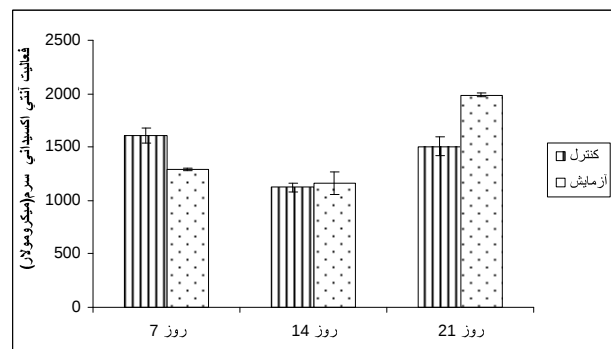
در تحقیقی که بر روی گیاه علف خرس که دارای بیشترین مقدار آربوتین در بین گیاهان می باشد، انجام شد مشخص گردید عصاره این گیاه در رت های دیابتی نسبت به گروه کنترل باعث کاهش قند خون نمی شود (۹). در این مطالعه عصاره برگ تلکا که نیز دارای مقادیر زیاد آربوتین است گلوکز خون را در مقایسه با گروه کنترل کاهش نداد. با وجود اینکه آربوتین به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی به تنهایی گلوکز خون را کاهش می دهد (۱۰) ولی در موارد فوق الذکر این اثر در عصاره های علف خرس و برگ گیاه تلکا که به ترتیب دارای ۴ تا ۱۵ درصد و ۷٪ آربوتین هستند مشاهده نشد (۱) که ممکن است بدلیل اثرات مواد مختلف موجود در عصاره ها و تنوع در حیوانات آزمایشگاهی و روش تحقیق باشد. آنتی اکسیدانهای موجود در گیاهان قادرند در بیماران دیابتی از پراکسیداسیون لیپیدی و تشکیل محصولات نهایی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی شامل MDA جلوگیری کنند (۱۱). اما در این مطالعه در Rat های نرمال تفاوت معنی داری بین پراکسیداسیون لیپیدها در بافتهای مختلف مشاهده نشد، احتمالا دلیل این امر



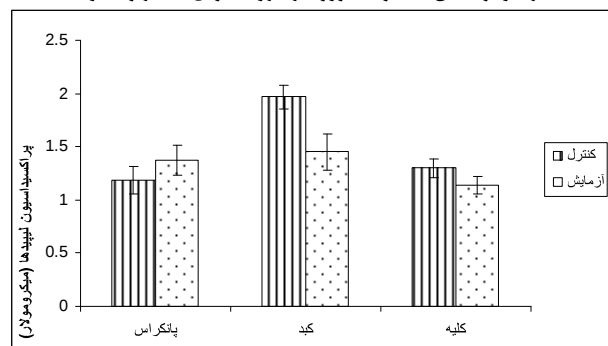
نمودار ۱. مقایسه غلظت گلوکز سرم (mg/dl) در گروه شاهد و گروههای کنترل و آزمایش در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ (هر گروه دارای ۸ سر رت بود)



نمودار ۲. مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی تام سرم (میکرومولار) در گروههای کنترل و آزمایش در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ (هر گروه دارای ۸ سر رت بود).



نمودار ۳. مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی بافت ها (میکرومولار) در گروه کنترل و آزمایش بعد از ۲۱ روز (هر گروه دارای ۸ سر رت بود)



نمودار ۴. مقایسه میزان پراکسیداسیون لیپیدها در بافت ها (میکرومولار) بعد از ۲۱ روز (هر گروه دارای ۸ سر رت بود)

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری سازمان ملی پرورش استعدادهای درخشان و معاونت تحقیقات و فن اوری و مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بابل در اجرای این طرح قدردانی می گردد.

غیردیابتی بودن هر سه گروه شاهد، کنترل و آزمایش است. نتایج تحقیق حاضر که برای اولین بار گزارش شده، نشان داد که عصاره برگ گیاه تلکا سبب افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در سرم و بافتهای کبد، کلیه و پانکراس میشود. تحقیقات تکمیلی بیشتری برای استفاده های بالینی از این گیاه ضروری به نظر می رسد.

Effects of *Pyrus Boissieriana* Buhse Leaves Extract on Antihyperglycemic, Antioxidant and Antilipidprooxidative in Rats

N. Gholizade¹, Z. Khanbabapoor¹, F. Habibnejad¹, M. Lakzaei (BSC)², M. Pouramir (PhD)³

1. Student, Farzanegan High School, Babol, Iran

2. MSc Student in Biochemistry Department, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

3. Associate Professor of Biochemistry & Biophysics, Cellular and Molecular Biology Research Center, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Received: May 15th 2009, Revised: Jul 15th 2009, Accepted: Sep 30th 2009.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Pyrus boissieriana* Buhse leaves extract has many of biological activities such as antioxidant, antilarva, antibacterial and antifungal in vitro. This study was designed to evaluate the effect of *Pyrus boissieriana* Buhse leaves extract on antihyperglycemic, antioxidant and antilipidprooxidative in normal rats.

METHOD: In this experimental study 56 adult male rats of Wistar strain, weighing 150 to 200 g, were randomized into blank, control and experimental groups (8 rats in each group). At the starting day, sampling from blank group was performed. Experimental group rats were treated with *Pyrus boissieriana* Buhse leaves extract (500 mg/kg) for 7, 14, 21 days (one day between). Control group rats were treated with water (1.5 ml) orally. Antihyperglycemic effect was evaluated in serum by glucose oxidase method whereas antioxidant and antilipidprooxidative were evaluated in serum and tissues. Antioxidant activity was evaluated by FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) method and lipid peroxidation was evaluated by TBARS method (Thiobarbituric Acid Reactive Substances).

FINDINGS: After 14 days of starting study, serum glucose concentrations in experimental group (55.61 ± 8.73 mg/dl) than blank group (99.51 ± 14.36) decreased significantly ($p=0.032$). Glucose changes between control and experimental groups were not significant in other days. Antioxidant activity in tissues and serum after 21 days in the experimental group (liver: 1178 ± 43.2 , kidney: 1031.9 ± 53.4 , pancreas: 164.6 ± 7.6 , serum: 1986 ± 182.2 μ M) than the control group (liver: 33.1 ± 4.5 , kidney: 544.63 ± 35.2 pancreas: 89.8 ± 8.8 , serum: 1505 ± 89 μ M) increased. But lipid peroxidation did not affected after consumption of *Pyrus boissieriana* Buhse leaves extract in tissues.

CONCLUSION: This study demonstrated the *Pyrus boissieriana* Buhse leaves extract has antioxidant activity in vivo in serum, liver, kidney and pancreas in normal rats.

KEY WORDS: *Pyrus boissieriana* Buhse, Antioxidant, Lipid peroxidation, Blood sugar.

*Corresponding Author;

Address: Department of Biochemistry & Biophysics, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

E-mail: pouramir@yahoo.com

References

1. Azadbakht M, Ramezani M, Jaqhromi Moghaddam M. Identification and quantification of arbutin in leaf of *Pyrus boissieriana* Buhse using HPLC and spectrophotometry. *Nameh Daneshgah* 2003; 13(4): 1-7.
2. Deisinger PJ, Hill TS, English JC. Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *J Toxicol Environ Health* 1996; 47(1): 31-46.
3. Hildebrand DC, Powell CC Jr, Schroth MN. Fire blight resistance in *Pyrus*: localization of arbutin and beta-glucosidase. *Phytopathology* 1969;59(10):1534-9.
4. Azadbakht M, Marston A, Hostettmann K, Ramezani M, Jahromi M. Biological activity of leaf extract and phenolglycoside arbutin of *Pyrus boissieriana* Buhse. *J Medicinal Plants* 2004; 3 (10): 9-14.
5. Gurib Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 2006; 27(1): 1-93.
6. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70-6.
7. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-10.
8. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 2004; 279(41): 42351-4.
9. Swanston Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR. Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice. *Acta Diabetol Lat* 1989; 26(1): 51-5.
10. Takii H, Matsumoto K, Kometani T, Okada S, Fushiki T. Lowering effect of phenolic glycosides on the rise in postprandial glucose in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997; 61(9): 1531-5.
11. Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 2005; 59(7): 365-73.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.