

بررسی تأثیر هیپر گلیسمی بر نورون‌های نیتریک اکسیدرژیک در هسته منزوی و نقش آن در تنظیم فشار خون در موش‌های دیابتی شده

معصومه کورش آرامی^{۱*}، عبدالرحمان صریحی^۱، ژیلا بهزادی^۱، سید منصور ملکوتی^۱، ایرج امیری^۲، رفعت زارع اکباتانی^۱

چکیده

مقدمه: هیپرتانسیون یکی از مشکلات افراد دیابتی می‌باشد که هنوز سازوکار تأثیر دقیق گلوکز بر این پدیده مشخص نشده است. شواهد نشان می‌دهد که نیتریک اکسید سنتز شده در دستگاه عصبی از جمله در هسته منزوی در تنظیم مرکزی قلب و عروق، بارورفلکس و آزادسازی آمینو اسیدهای تحریکی دخالت دارد. در این مطالعه بر آنیم تا تأثیر هیپرگلیسمی را بر نورون‌های نیتریک اکسیدرژیک روی هسته منزوی در دیابت بررسی کنیم. **روش‌ها:** به این منظور تعداد ۱۸ عدد موش نر با نژاد ویستار دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین را با اورتان بیهوش کرده و پس از کانول گذاری در هسته منزوی، فشار خون را با استفاده از یک کانول داخل شریانی ثبت کردیم. **یافته‌ها:** نتایج نشان داد که تزریق یکطرفه گلو تامات ($78 \text{ Pmol}/60\text{nl}$) و سدیم نیتروپروساید (100 mM) به هسته منزوی فشار خون شریانی را کاهش می‌دهد. در صورتی که تزریق یکطرفه L-NAME (1 nm) فشار متوسط شریانی را افزایش می‌دهد. **نتیجه‌گیری:** این نتایج نشان می‌دهد که بخشی از تأثیر گلوکز بر افزایش فشار خون در حیوانات دیابتی از طریق نورون‌های نیتریک اکسیدرژیک در هسته منزوی اعمال می‌شود.

واژگان کلیدی: هیپرگلیسمی، نیتریک اکسید، گلو تامات، L-NAME، سدیم نیتروپروساید، دیابت، موش

مقدمه

قسمت‌های مختلف قشر مغز از جمله در هسته منزوی (NTS) صورت می‌گیرد [۱-۴]. NTS که اطلاعات آوران احشایی مثل بارورسپتورها را پردازش کرده و نقش مهمی در کنترل اتونومیک سیستم قلبی عروقی دارد، دارای NOS سنتاز (نیتریک اکسید سنتاز) در نورون‌های خود و انتهای آوران مرکزی و آوران‌های حسی می‌باشد [۵-۷]. اخیراً مشخص شده است که تزریق یکطرفه L-Arg به NTS در موش‌های بیهوش، کاهش وابسته به دوز قابل ملاحظه‌ای در فشار

مطالعات قبلی نشان داده اند که نیتریک اکسید به عنوان عامل متسع کننده مشتق از اندوتلیوم در دستگاه عصبی مرکزی همانند سایر بافت‌ها، از L-Arg آرژینین (L-Arg) ساخته می‌شود و ممکن است از طریق فعال کردن گوانیلات سیکلاز و تشکیل cGMP، در ارتباطات بین سلولی نقش داشته باشد. سنتز نیتریک اکسید (NO) در

- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

* **نشانی:** همدان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی. تلفن: ۰۸۱۱-۸۲۶۵۵۴۰؛ نمابر: ۰۸۱۱-۸۲۷۶۲۹۹؛ پست

الکترونیک: masoomeh_k@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۸۳/۷/۱۲

تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۲/۸

روش‌ها

تعداد ۱۸ عدد موش بزرگ آزمایشگاهی (Rat) نر با نژاد ویستار و متوسط وزن بین ۲۵۰-۳۰۰ گرم که از انستیتو پاستور خریداری شده بودند را انتخاب کردیم. موش‌ها در قفسه‌های مجزا در یک اتاق که نور آن کنترل می‌شد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دما بین ۲۹°C-۲۳°C بود، نگهداری می‌شدند. سپس آنها را با یک‌بار تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (۶۵mg/kg) دیابتی نمودیم. ۲۴ ساعت بعد برای حصول اطمینان از دیابتی بودن آنها، گلوکز پلاسمایی اندازه‌گیری شد که مقدار آن نباید کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی لیتر می‌بود [۱۶].

دو سه روز بعد موش‌های دیابتی را با اورتان (۱rg/kgIP) بیهوش نمودیم. بعد با روش استاندارد جراحی استفاده از دستگاه استرئوتاکسی یک عدد کانول راهنما (سر سوزن gauge ۲۳) را در مختصات بالای هسته بر اساس اطلس استریوتاکسیک پاکسینوس و واتسون (DV= ۸mm) فشار خون توسط یک کانول جاگذاری شده در شریان فمورال و متصل به یک ترانس دیوسر فشار (Gould P 23 ID) و پلی‌گراف NARCO اندازه‌گیری شد. بعد از اندازه‌گیری فشارخون در حالت پایه برای مشخص کردن فعالیت تحریک شده هسته NTS، گلوتامات را به میزان $78 \mu\text{mol}/60 \text{nl}$ با استفاده از سرنگ همپلتون و سر سوزن تزریقی (۳۰ gauge) به داخل هسته همه رت‌های دیابتی تزریق کردیم.

در صورت کاهش فشار خون پس از ده دقیقه، در گروه اول (آزمایش اول $n=9$) L-NAME (۱nmol) برای مهار نوروهای نیتریک اکسیدریک (و در گروه دوم (آزمایش دوم $n=9$) سدیم نیتروپروساید (۱۰۰mmol) را تزریق کردیم. تعداد نمونه در هر گروه ۶ سر بود. فشار سیستولیک و فشار دیاستولیک برای تمام نمونه‌ها در وضعیت پایه و پس از تزریق در زمان مشاهده حداکثر پاسخ ثبت شد. در مورد موش‌های آزمایش دوم ثبت فشار خون تا یک ساعت پس از تزریق نیز انجام شد. همچنین در گروه دوم ده دقیقه بعد از تزریق گلوتامات SNP تزریق شد تا تأثیر آن با اثر تحریکی کلی گلوتامات مقایسه شود.

متوسط شریانی و تعداد ضربان قلب ایجاد می‌کند [۸]. این نشان می‌دهد که L-Arg موجود در NTS به NO تبدیل شده و این ماده با انتشار به داخل انتهاهای پیش سیناپسی یا آستروسیت‌های مجاور، گوانیلات سیکلاز را فعال کرده است. تولید cGMP باعث تحریک کانال‌های یونی سدیم و کلسیم می‌شود. با افزایش ورود کلسیم، نوروها و گیرنده‌های آمینواسید تحریکی فعال می‌شوند که این موجب کاهش فشار خون و تعداد ضربان قلب می‌گردد [۹-۱۰]. از طرفی مشاهده شده که تزریق مهارکننده NOS تأثیرات همودینامیکی ناشی از فعالیت رفلکس بارورسپتور را کاهش می‌دهد [۱۱]. پس NO به طور تونیک در NTS آزاد می‌شود تا فشار خون را کاهش دهد [۱۲]. به‌علاوه NO و آمینو اسیدهای تحریکی مثل گلوتامات (GLU) روی آزاد سازی یکدیگر در NTS اثر تحریکی متقابل می‌گذارند [۱۳].

Vitagliano و همکارانش نشان دادند که تزریق یک‌طرفه سدیم نیتروپروساید (SNP، دهنده نیتریک اکسید) به NTS موش‌های بیهوش، فشار خون شریانی را کاهش می‌دهد که این اثر در صورت تجویز قبلی دپلتیازم (مسدود کننده کانال کلسیم) عمدتاً مهار می‌شود. پس NO از طریق فعال کردن کانال کلسیم در تنظیم قلبی عروقی در NTS دخالت می‌کند [۱۴].

نوروهای زیادی در قسمت دمی NTS به نوسانات متوسط گلوکز پاسخ می‌دهند؛ به طوری که در مطالعه ای از بین ۱۱۲ نورو بررسی شده؛ ۵۷ نورو با افزایش سطح گلوکز فعالیت خود را بالا بردند. از طرفی، انفوزیون گلوکز، اگر همراه بابلوک سنتز NO باشد؛ افزایش بیشتری در فشار خون ایجاد می‌کند [۱۵].

با وجود مطالعاتی که تا کنون صورت گرفته، سازوکار دقیق و مشخص هیپرگلیسمی در ایجاد هیپرتانسیون در افراد دیابتی مجهول مانده است. در این مطالعه برآنیم تا تأثیر هیپرگلیسمی را بر نوروهای نیتریک اکسیدریک NTS و نقش آن را در تنظیم فشار خون رت‌های دیابتی بررسی کنیم.

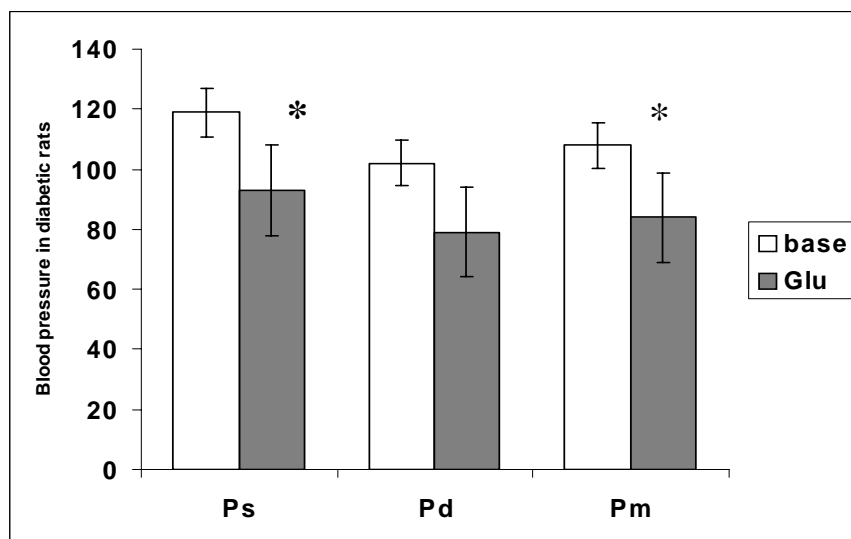
بود، نتایج مربوط به این نمونه‌ها از آنالیز آماری حذف شد.

یافته‌ها

نتایج تزریق گلو تامات در هسته NTS موش‌های دیابتی:
نتایج این بخش نشان داد که با تزریق یک طرفه L- گلو تامات به NTS، فشار خون نسبت به وضعیت پایه به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0.001$)، به طوری که فشار متوسط شریانی از مقدار پایه $10.8 \pm 7/6$ mmHg به حدود $14/9 \pm 8/4$ mmHg رسید (جدول ۱). بنابراین در موش‌های دیابتی تزریق L- گلو تامات در هسته NTS سبب کاهش فشار متوسط شریانی می‌گردد (نمودار ۱). برای مطالعه تأثیرات قلبی عروقی NO از L-NAME و سدیم نیتروپروساید استفاده شد (آزمایش ۱ و ۲).

در طی آزمایش، محل تزریق داروها در NTS به وسیله پاسخدهی به L- گلو تامات تعیین شد به طوری که بعد از تزریق $2/3$ نانومول گلو تامات به NTS، فشارخون حداقل 35 mmHg کاهش یافت که این پاسخ به یک سوم میانی آن محدود می‌شود. همچنین تزریقات در مدت بیش از ۱۰ ثانیه انجام شد. داروها نیز در سالیان استریل حل شدند تا به حجم کمتر از 60 nl برسند [۱].

برای تجزیه و تحلیل آماری از روش Paired T Test (مقایسه قبل و بعد از تزریق) استفاده کردیم $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. همه اطلاعات به صورت $Mean \pm SD$ نشان داده شدند. ضمناً در مورد تمام نمونه‌ها پس از آزمایش، بررسی بافت شناسی انجام شد و چنانچه محل تزریق بطور صحیح در محل هسته NTS قرار نگرفته

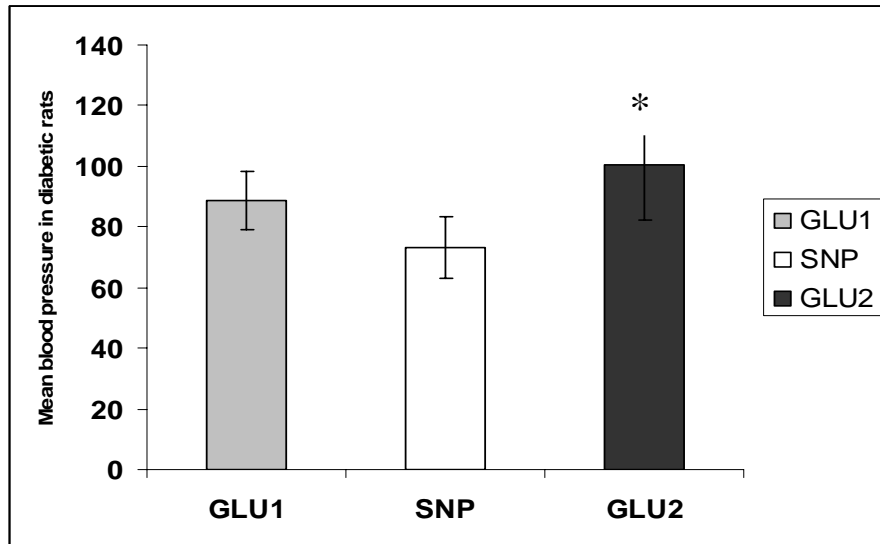


نمودار ۱- تأثیرات تزریق یکطرفه L- گلو تامات ($2/3$ nmol) در NTS، بر فشار خون موش‌های دیابتی که با اورتان بیهوش شدند. داده‌ها بصورت $Mean \pm SEM$ نشان داده شده است. (P_S : فشار سیستولیک، P_D : فشار دیاستولیک، P_M : فشار متوسط شریانی، $n=18$)
*: اختلاف معنی دار نسبت به پایه $P < 0.05$

جدول ۱- مقایسه اثرات L- گلو تامات، سدیم نیتروپروساید و L-NAME بر فشار سیستولیک، دیاستولیک و متوسط شریانی

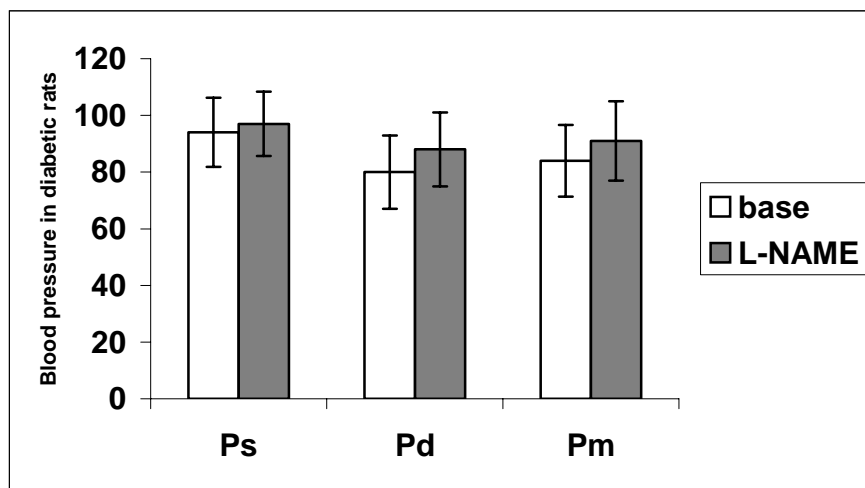
	قبل از تزریق دارو (پایه)			بعد از تزریق دارو		
	P_M	P_D	P_S	P_M	P_D	P_S
گلو تامات	$119 \pm 8/02$	$102 \pm 7/6$	$108 \pm 7/6$	$108 \pm 7/6$	$79 \pm 14/92$	$84 \pm 14/92$
LNAME	$94 \pm 12/18$	$80 \pm 12/94$	$84 \pm 12/64$	$84 \pm 12/64$	88 ± 13	91 ± 40
SNP	$102 \pm 7/52$	$83 \pm 8/6$	$89 \pm 8/21$	$89 \pm 8/21$	$67 \pm 10/07$	$73 \pm 10/11$

داده‌ها بصورت $Mean \pm SEM$ نشان داده شده است. (P_S : فشار سیستولیک، P_D : فشار دیاستولیک، P_M : فشار متوسط شریانی، در گروه گلو تامات $n=18$ ولی در دو گروه دیگر $n=9$) * اختلاف معنی دار نسبت به پایه $P < 0.05$



نمودار ۲ - تأثیرات تزریق یکطرفه سدیم نیتروپروساید (۱۰۰mM) به داخل NTS، بر فشار خون موش‌های دیابتی که با اورتان بیهوش شدند.

داده‌ها بصورت $Mea \pm SEM$ نشان داده شده است. (P_S : فشار سیستولیک، P_d : فشار دیاستولیک، P_m : فشار متوسط شریانی، $n=9$)
* : اختلاف معنی‌دار نسبت به پایه $P < 0/05$



نمودار ۳ - تأثیرات تزریق یکطرفه L- گلوتامات (۲/۳nmol) به داخل NTS بر فشار خون قبل و بعد از تزریق SNP در موش‌های دیابتی که با اورتان بیهوش شدند.

داده‌ها بصورت $Mea \pm SEM$ نشان داده شده است. (P_S : فشار سیستولیک، P_d : فشار دیاستولیک، P_m : فشار متوسط شریانی، $n=9$)
* : اختلاف معنی‌دار نسبت به پایه $P < 0/05$

نتایج آزمایش ۱: نتایج این آزمایش نشان داد که تزریق سدیم نیتروپروساید موجب کاهش معنی‌دار فشار متوسط شریانی از سطح پایه $89 \pm 8/2$ به $73 \pm 10/1$ mmHg شد ($P < 0/05$)، جدول ۱). بر این اساس مشخص می‌شود که در موش‌های دیابتی تزریق سدیم نیتروپروساید در هسته NTS سبب کاهش فشار متوسط شریانی می‌شود (نمودار ۲). از طرفی در این آزمایش برای مقایسه اثرات

SNP و GLU بر فشار خون، تغییر فشار خون در پاسخ به تزریق GLU قبل و بعد از تزریق SNP هم اندازه‌گیری شد که به ترتیب $88/6 \pm 9/7$ و $118/31 \pm 10/66$ (بود و این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$ ، نمودار ۳).

نتایج آزمایش ۲: طبق نتایج این بخش، تزریق L-NAME به NTS فشار متوسط شریانی را در موش‌های دیابتی به طور معنی‌داری تغییر نداد (فشار خون پایه = $84 \pm 12/6$ و

نتایج آزمایش ۱: نتایج این آزمایش نشان داد که تزریق سدیم نیتروپروساید موجب کاهش معنی‌دار فشار متوسط شریانی از سطح پایه $89 \pm 8/2$ به $73 \pm 10/1$ mmHg شد ($P < 0/05$)، جدول ۱). بر این اساس مشخص می‌شود که در موش‌های دیابتی تزریق سدیم نیتروپروساید در هسته NTS سبب کاهش فشار متوسط شریانی می‌شود (نمودار ۲). از طرفی در این آزمایش برای مقایسه اثرات

مرکزی را کاهش داده و کاهش فشار خون ایجاد شده توسط L- گلوتامات را از طریق رفلکس‌های مشابه بارورسپتور و مهار فعالیت اعصاب سمپاتیک کلیوی در NTS، میانجی‌گری می‌کند [۲۱] و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که گلوتامات به عنوان یک اسید آمینه محرکی با تحریک نورون‌های نیتریک اکسیدرژیک در NTS موجب کاهش فشار خون در رت‌های دیابتی می‌شود.

در مطالعات قبلی مشخص شده که تزریق L- Arg به NTS اثرات دپرسوری وابسته به دوز ایجاد می‌کند. این یافته نشان داد که L-Arg توسط NOS موجود در NTS تبدیل به NO شده است. در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که تزریق سدیم نیتروپروساید به این هسته موجب کاهش فشار خون در رت‌های دیابتی می‌شود که علت آن این می‌تواند باشد که SNP هم با تولید NO و cGMP موجب افزایش ورود کلسیم به نورن‌های NTS و در نتیجه فعال شدن نورون‌ها و گیرنده‌های آمینواسیدهای تحریکی کاهش دهنده فشار خون شده است [۱۱].

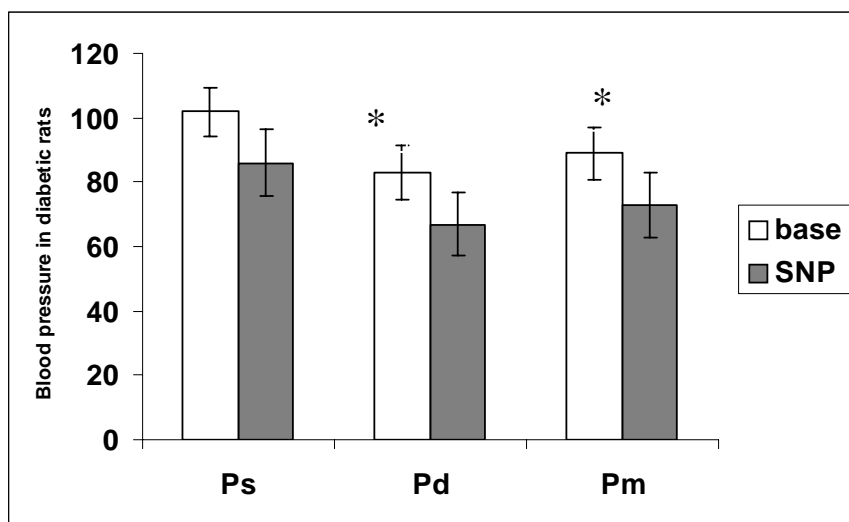
در مطالعه حاضر، تزریق یک‌طرفه L-NAME موجب افزایش فشار خون شد که از نظر آماری معنی‌دار نبود.

فشار خون پس از تزریق L-NAME $(91 \pm 12/4)$. بنابراین L-NAME تأثیر افزایشی یا کاهشی بر فشار خون موش‌های دیابتی ندارد (نمودار ۴).

بحث

سیستم نیتریک اکسیدرژیک نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های قلبی عروقی دارد که هنوز محل دقیق عملکرد آن در تنظیم قلب و عروق مشخص نیست. البته مطالعات قبلی نشان داده‌اند که نیتریک اکسید سنتاز در قشر مغز، مخچه، ساقه مغز و دیگر نواحی مغز منتشر شده است [۱].

در مطالعه حاضر مشخص شد که تزریق گلوتامات به NTS موش‌های دیابتی موجب کاهش فشار خون می‌شود. NO و آمینواسیدهای تحریکی روی آزادسازی یکدیگر در NTS مؤثرند [۱۳] به طوری که NO آزاد سازی آمینواسیدهای تحریکی در قسمت پشتی میانی بصل‌النخاع را از طریق راه‌های وابسته به cGMP افزایش می‌دهد [۱۸] و همچنین L- گلوتامات از طریق گیرنده‌های NMDA و non NMDA در NTS تأثیرات قلبی عروقی ایجاد می‌کند [۱۹]، به نحوی که تحریک گیرنده‌های NMDA، تشکیل NO را در CNS افزایش می‌دهد [۲۰]. NO نیز برون ده سمپاتیکی



نمودار ۴ - تأثیرات تزریق یکطرفه L-NAME (۱mm) به داخل NTS، بر فشار خون موش‌های دیابتی که با اورتان بیهوش شدند.

داده‌ها بصورت $Mean \pm SEM$ نشان داده شده است. Ps: فشار سیستولیک، Pd: فشار دیاستولیک، Pm: فشار متوسط شریانی، (n=9)

*: اختلاف معنی‌دار نسبت به پایه $P < 0.05$

GLU به عنوان یک ناقل عصبی تحریکی موجب تحریک نورون‌های نیتریک اکسیدرژیک ذاتی هسته NTS می‌شود ولی SNP به عنوان دهنده NO، میزان NO را در هسته افزایش می‌دهد. با توجه به این که تأثیر کاهش SNP بر فشار خون بیشتر است؛ می‌توان نتیجه گرفت که نورون‌های نیتریک اکسیدرژیک ذاتی هسته NTS به نحوی در موش دیابتی مهار شده است. این مهار با توجه به حساسیت بسیاری از نورون‌های NTS به نوسانات قند خون، ممکن است ناشی از اثر مستقیم خود گلوکز یا به‌طور غیر مستقیم ناشی از تحریک نورون‌های مهار کننده NO توسط گلوکز باشد.

Tseng و همکارانش در مطالعه‌ای مشاهده کردند که اثرات دوز پائین (۱۰nmol) و دوز بالای (۱۰۰nmol) L-NAME با وجود تزریق قبلی گلوتامات بر فشار خون متفاوت است. آنها فرض کردند که در طی تزریق دوز پایین آن، فعالیت NOS ساختمانی مهار می‌شود ولی فعالیت NOS القا شده توسط گلوتامات هنوز وجود دارد که موجب تبدیل L-Arg به NO ساختمانی و اثر دپرسوری می‌شود. از طرفی دوز بالای L-NAME موجب مهار هر دو NOS ساختمانی و القایی در NTS و ایجاد اثر دپرسوری می‌شود [۱۱].

مقایسه نتایج حاصل از تزریق GLU و SNP به NTS نشان داد که SNP بیشتر از GLU فشارخون را کاهش می‌دهد.

مآخذ

- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 1990; 347: 768–770.
- Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86: 5159–5162.
- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333: 664–666.
- Ignarro LJ. Nitric oxide: a novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension*. 1990; 16: 477–483.
- Reis DJ. The brain and hypertension: reflections on 35 years of inquiry into the neurobiology of the circulation. *Circulation*. 1984; 70(suppl III): III-3–III-45.
- Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the brain. *Neuroscience*. 1992; 46: 755–784.
- Ruggiero DA, Mtui EP, Otake K, Anwar M. Central and primary visceral afferents to nucleus tractus solitarius may generate nitric oxide as a membrane-permeant neuronal messenger. *J Comp Neurol*. 1996; 364: 51–67.
- Tagawa T, Imaizumi T, Harada S, Endo S, Shiramoto M, Hirooka Y, Takeshita A. Nitric oxide influences neuronal activity in the nucleus tractus solitarius of rat brainstem slices. *Circ Res*. 1994; 75: 70–76.
- Paupardin-Tritsch D, Hammond C, Gerschenfeld HM, Nairn AC. cGMP-dependent protein kinase enhances Ca^{++} current and potentiates the serotonin-induced Ca^{++} current increase in snail neurons. *Nature (Lond)*. 1986; 323: 812-814.
- Simmons ML, Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J Neurochem*. 1992; 59: 897-905.
- Tseng CJ, Liu HY, Lin HC, Ger LP, Tung CS, Yen MH. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brainstem nuclei of rats. *Hypertension*. 1996; 27: 36–42
- Lo WJ, Liu HW, Lin HC, Ger LP, Tung CS, Tseng CJ. Modulatory effects of nitric oxide on baroreflex activation in the brainstem nuclei of rats. *Chin J Physiol*. 1996; 39: 57–62
- Lo WC, Lin HC, Ger LP, Tung CS, Tseng CJ. The cardiovascular effects of nitric oxide and NMDA receptors in the nucleus tractus solitarius of rats. *Hypertension*. 1997; 30: 1499–1503.
- Vitagliano S, Berrino L, Damico M, Maione S, De Novellis V, Rossi F. Involvement of nitric oxide in cardiorespiratory regulation in the nucleus tractus solitarii. *Neuropharmacology* 1996; 32: 625-31.
- Dallaporta M, Himmi T, Perrin J, Orsini JC. Solitary tract nucleus sensitivity to moderate changes in glucose level. *Neuroreport* 1999; 10: 2657-60.
- Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS & Goldstein JL Insuline selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin – induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 14191-2.
- Pexinos G. and Watson C, The rat brain in stereotaxic coordinates, San Diego, Academic press, 1986.
- Lawrence AJ, Jarrott B. Nitric oxide increases interstitial excitatory amino acid release in the rat dorsomedial medulla oblongata. *Neurosci Lett*. 1993; 151: 126–129.
- Talman WT, Perron MH, Reis DJ. Evidence of L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. *Science* 1980; 209: 813–815.

20. Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1991; 14: 60-67.
21. DiPaola ED, Vidal MN, Nistico G. L-Glutamate evokes the release of an endothelium-derived relaxing factor-like substance from the rat nucleus tractus solitarius. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991; 17: 5269-5272.