تأثیر آنزیم آلکالین فسفاتاز بر آنزیم‌ها و پروتیئن‌های کبد موش صحرائی بر پایه مهار آنزیمی

الهه سامانی جهرمی[1]، سمانه ذوالقدری جهرمی[2*]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
۲ـ گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران
*مسئول مکاتبات: z.jahromi@ibb.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۲۴

چکیده

کبد بزرگترین غده بدن است که دارای ترشحات مختلفی می‌باشد و آنزیم آلکالین فسفاتاز از جمله این ترشحات می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش یافتن تأثیر آنزیم آلکالین فسفاتاز بر آنزیم‌ها و پروتئین‌های کبد موش صحرائی بر پایه مهار آنزیمی توسط L–هموآرژنین می‌باشد. این مطالعه تجربی روی ۳۵ سر موش صحرائی نر بالغ انجام شد. موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه هفت تائی کنترل، شاهد، تجربی ۱، ۲ و ۳ تقسیم شدند. به گروه کنترل آب و غذا داده شد. گروه شاهد صرفاً حلال تزریق شد. در گروه تجربی۱، مقدار ۰/۲ میلی-گرم بر میلی‌لیتر آنزیم آلکالین فسفاتازتزریق گردید. گروه تجربی ۲: مقدار ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مهار کننده L–هموآرژنین تزریق گردید. در گروه تجربی۳، ابتدا مقدار ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر L– هموآرژنین و بعد از دو ساعت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنزیم آلکالین فسفاتاز تزریق گردید. همه تزریق‌ها برای مدت ۵ روز انجام شد. داده‌های آماری توسط آزمون ANOVA و دانکن در سطح معناداری $P<0.05$ توسط نرم‌افزار SPSS نسخه۱۵ تعیین گردید. فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) دارای افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (در سطح $p<$ ۰/۰۵) می‌باشد و در میزان فعالیت آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و غلظت پروتئین کل و آلبومین تغییر معنی‌داری مشاهده نگردید. تزریق آلکالین فسفاتاز سبب افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و آسپارتات آمینوترانسفراز می‌گردد و همچنین سبب تخریب بافت کبد می‌شود. استفاده از مهار کننده‌L–همو آرژنین باعث جلوگیری از تخریب سلول های کبد می‌گردد.

کلمات کلیدی :آلکالین فسفاتاز، کبد، مهار آنزیم، L– هموآرژنین.

مقدمه

کبد بزرگترین غده بدن، می‌تواند به عنوان یک کارخانه شیمیایی در نظر گرفته شود که تعداد زیادی از مواد درگیر در متابولیک را می‌سازد، ذخیره می‌کند، تغییر می‌دهد و ترشح می‌کند [٦]. کبد می‌تواند تا ۱۰۰ وظیفه‌ی گوناگون را بر عهده داشته باشد که بیشتر آنها به وسیله‌ی هپاتوسیت‌ها انجام می‌گیرند [۲]. سلول‌های کبدی احتمالاً ماهرترین سلول‌های بدن می‌باشند [۳].

نخستین آنزیم کبدی که ارزش کلینیکی آن شناخته شد آلکالین فسفاتاز (ALP) بود. در سال ۱۹۲۰ دریافتند که این آنزیم در بیماری‌های کبد و استخوان افزایش می‌یابد [١٦]. این آنزیم در خون به اشکال متفاوتی وجود دارد. در کبد و استخوان به میزان زیاد یافت می‌شود، اما در نسوج دیگر مانندکلیه، جفت، جداره روده، غده تیموس، ریه و بیضه نیز یافت می‌گردد [۱۵، ۲۰]. آنزیم آلکالین فسفاتاز دارای ایزوفرم‌های کلیه و کبد می‌باشد [۲۵، ۲۸]. آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در سیتوپلاسم سلول‌های کبدی چندین برابر بیشتر مایع خارج سلولی است، زمانی که غشاء آسیب ببیند، ALT از آن خارج می‌شود و غلظت سرمی آن افزایش پیدا می‌کند. میزان افزایش ALT نشانه ای از درجه وسعت ضایعه کبدی می‌باشد [۹]. آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) آنزیمی است که عمدتاً در عضله قلب و کبد، با مقادیر متوسط در عضله اسکلتی،

کلیه‌ها و لوزالمعده یافت می‌شود. غلظت آن در خون پایین است بجز زمانی که آسیب سلولی وجود داشته باشد، که در آن صورت مقادیر زیادی به داخل خون آزاد می‌شود [۵]. آلبومین عنصر برجسته پروتئین‌های پلاسمایی است که مقدار آن با شرایط تغذیه‌ای، عملکرد کبد و کلیه و وجود بیماری‌های مختلف تغییر می‌کند. اندازه‌گیری آلبومین سرم، معیاری جهت برآورده شدت بیماری‌های کبدی به دست می‌دهد [۳]. به طور کلی آلبومین شاخص فعالیت کبد به شمار می‌رود، ولی نشانه اختصاصی نیست، در سیروز کبدی و آب‌آوردگی شکم این امکان وجود دارد که کاهش آلبومین مشاهده شود [۱۷]. افشارنژاد و همکاران نیز در پژوهشی که تاثیر کریستال بر آنزیم‌های کبدی را مطالعه کرده بودند، نشان دادند که مصرف کریستال یکی از عوامل مهم در افزایش میزان آلکالین فسفاتاز در معتادین به کریستال است و نسبت به دو آنزیم دیگر کبدی (ALT وAST) سطح ALP را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱]. چینگ و همکاران اعلام کردند که سطح سرمی ALP، با مصرف سیگار و نوشیدنی‌های الکلی افزایشمی یابد [۱۱].

هدف از انجام این تحقیق یافتن تأثیر آنزیم آلکالین فسفاتاز بر آنزیم‌ها و پروتئین‌های کبد موش صحرائی بر پایه مهار آنزیمی توسط L– هموآرژنین می‌باشد.

مواد و روش کار

این پژوهش یک مطالعه‌ی تجربی است که در زمستان ۱۳۹۱ انجام گردیده است. نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شده است. در ابتدا تعداد ۳۵ سر موش نر بالغ از نژاد ویستار از خانه حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم خریداری و جهت تطابق با محیط به مدت دو هفته در اتاق حیوانات نگهداری شد. سن موش‌ها حدود ۱۱۰–۹۰ روز و ۲۱۰–۱۹۰ گرم وزن داشتند. در طول مدت انجام این پژوهش حیوانات در شرایط مناسب، با درجه حرارت کنترل شده ۱ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد، دوره ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۵۵–۵۰ درصد نگهداری شدند. باید توجه داشت که آنزیم آلکالین فسفاتاز و L–هموآرژنین به صورت پودر (ساخت شرکت سیگما آلمان) تهیه گردید و حلال آنها نیز بافر تریس(ساخت شرکت مرک آلمان) در نظر گرفته شد. در هر یک از گروه‌ها ۷ سر موش که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند به شرح زیر مورد بررسی قرارگرفتند:

گروه کنترل: در این گروه هیچ تیماری برای حیوانات انجام نگرفت و حیوانات فقط از آب و غذای معمولی استفاده کردند.

گروه شاهد: در این گروه حیوانات صرفاً حلال (تریس۹/۵ =pH) تزریق گردید.

گروه تجربی ۱: در این گروه به حیوانات مقدار mg/ml ۰/۲ آنزیم آلکالین فسفاتاز تزریق شد. گروه تجربی ۲: در این گروه حیوانات L - هموآرژنین به میزان mg/ml ۲ دریافت کردند. گروه تجربی ۳: در این گروه حیوانات ابتدا L- هموآرژنین به میزان mg/ml ۲ و پس از گذشت۲ ساعت mg/ml ۰/۲ آنزیم آلکالین فسفاتاز برای هر موش تزریق گردید.

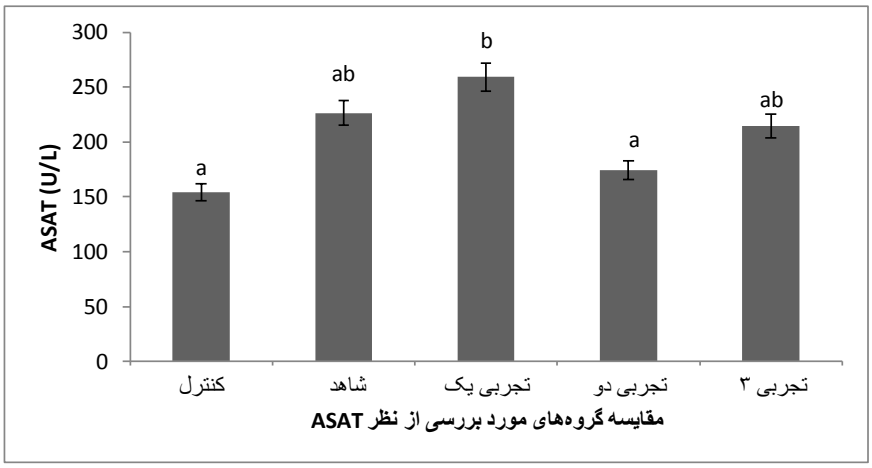
همه تزریقات به روش داخل صفاقی انجام گرفت. در روز ششم موش‌ها به وسیله دی اتیل اتر بیهوش گردیدند. سپس با استفاده از سرنگ ۵ سی سی از قلب حیوانات خونگیری انجام شد سپس خون به داخل لوله‌های آزمایش ریخته شد و لوله‌های حاوی خون در حمام آب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده تا خون ها کاملاً لخته شوند بعد لوله ها را با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده تا سرم خون جدا گردد سپس به کمک سمپلر و سر سمپلر سرم خارج و درون لوله‌های جداگانه (اپندورف) ریخته شد سپس سرم ها را با استفاده از کیت های (ساخت شرکت پارس آزمون ایران) و استفاده از روش اسپکتروفتومتر از نظر فعالیت آنزیم های آلانین‌آمینوترانسفراز (ALAT)، آسپارتات آمینوترانسفراز (ASAT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، غلظت آلبومین و پروتئین کل مورد بررسی قرار گرفت. اعداد بدست آمده،

بر اساس اطلاعات بدست آمده از آنالیز اعداد توسط ANOVA (One-way) و توسط نرم افزار SPSS ویرایش ۱۵، نمودار آن رسم گردید. مقادیر بکار گرفته شده میانگین ± خطای انحراف از معیار (SEM) و سطح معنی دار $p< ۰/۰۵$ می‌باشد.

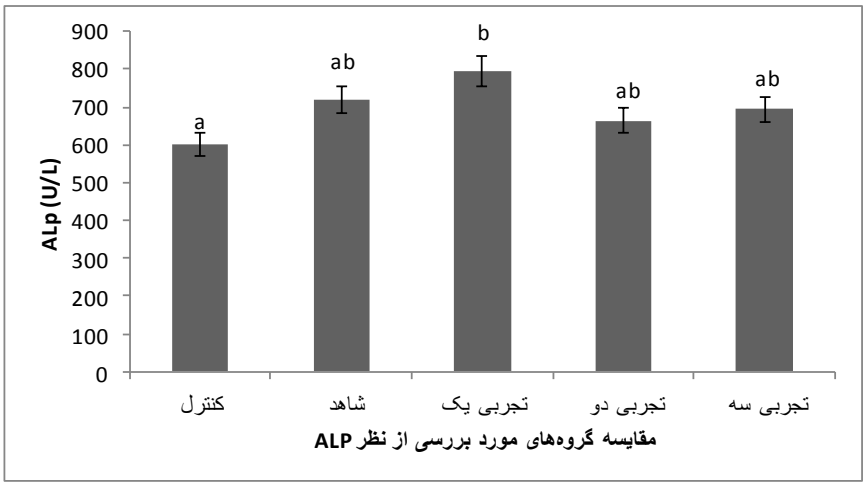
نتایج

این مطالعات نشان داد که فعالیت آنزیم AST دارای افزایش معنی داری در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه های کنترل و تجربی ۲ در سطح $p< ۰/۰۵$ می‌باشد (نمودار۱). فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نیز در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معنی‌دار در سطح $p< ۰/۰۵$ می‌باشد (نمودار۲).

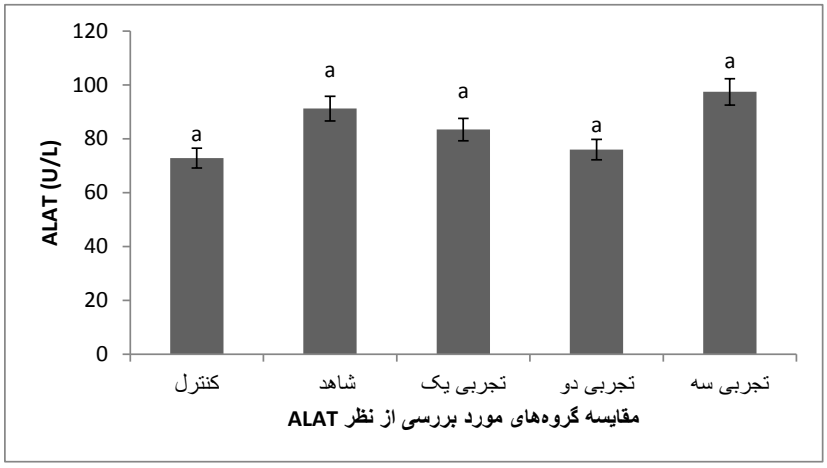
فعالیت آنزیم ALT (نمودار۳) و غلظت آلبومین (نمودار٤) و پروتئین کل (نمودار۵) اختلاف معنی‌داری نشان نداد.



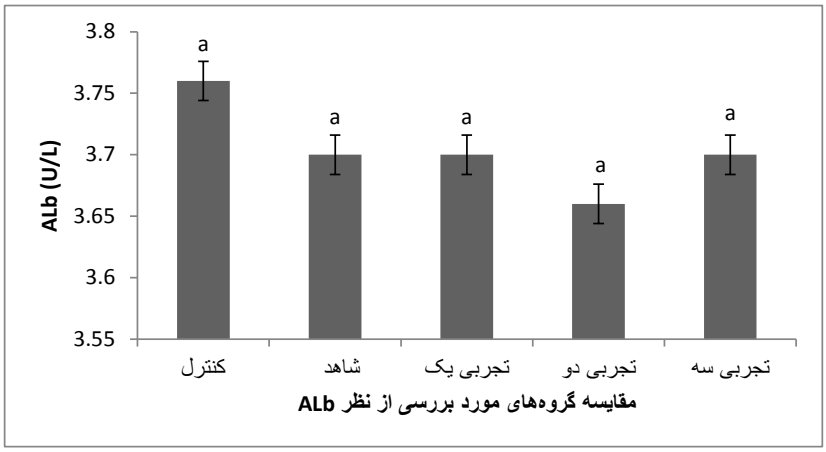
نمودار ۱ـ نتایج مربوط به میانگین تغییرات فعالیت آسپارتات آمینوترانسفراز (ASAT). مقادیر به صورت Mean ± S.E نشان داده شده است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با همدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.



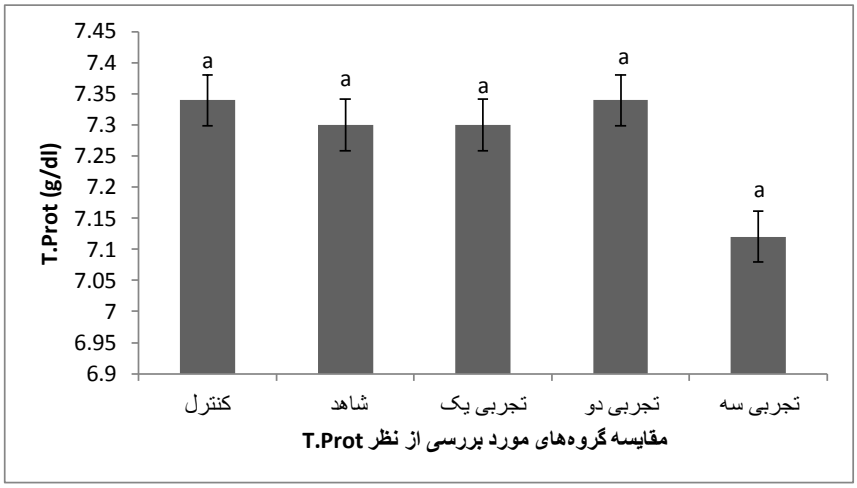
نمودار ۲ـ نتایج مربوط به میانگین تغییرات فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP). ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک با همدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.



نمودار ۳ـ نتایج مربوط به میانگین تغییرات فعالیت آلانین آمینوترانسفراز (ALAT). گروه‌ها با همدیگر تفاوت معنی داری ندارند.



نمودار ٤ نتایج مربوط به میانگین تغییرات غلظت آلبومین. گروه‌ها با همدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.



نمودار ۵ـ نتایج مربوط به میانگین تغییرات غلظت پروتئین تام (T.Prot). گروه‌ها با همدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

بحث

اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز سرم در بررسی دو دسته از بیماری‌های اهمیت زیادی دارد که شامل بیماری‌های کبدی ـ صفراوی و بیماری‌های استخوانی می‌باشد که در بیماری‌های استخوانی همراه با افزایش فعالیت استخوان-سازی می‌باشد. در صورت وجود همزمان بیماری‌های کبدی و استخوانی، اندازه گیری فعالیت ایزوآنزیم های مختلف ارزش بالینی زیادی دارد و نشان دهنده میزان و وسعت آسیب بافت مورد نظر می‌باشد. بر اساس مطالعات انجام شده تعیین فعالیت ایزوآنزیم‌های (ALP) در اختلالات مختلف از ارزش تشخیصی زیادی برخوردار است [۲۶]. فعالیت آلکالین فسفاتاز تام سرم بستگی به فعالیت بافت‌های مختلف تولید کننده این آنزیم دارد که خصوصاً بافت استخوانی، کلیوی، روده‌ای و کبدی را می‌توان نام برد. کاهش در تغییرات فعالیت آلکالین فسفاتاز می‌تواند همراه با افزایش یکی از ایزوآنزیم ها و کاهش در ایزوآنزیم دیگر باشد [۱۰]. آلکالین فسفاتاز که یکی از مارکرهای اختلالات کبدی است در بیماری های دیگر از جمله بیماری‌های خودایمنی و برخی بیماری‌های عفونی و التهابی تغییرات آشکاری دارد [۲۱]. امواج اولتراسوند متناوب در مدت زمان مشخصی باعث حداکثر افزایش در فعالیت (ALP) و روند استخوان سازی می-شوند و استفاده بیشتر ازآنها تغییرات چندانی ایجاد نمی کند[۵]. فعالیت آلکالین فسفاتاز در بافت‌های مختلف و از جمله سرم مشاهده می‌شود. مقدار این آنزیم در سرم بیماری‌های مختلف به ویژه کبدی و صفراوی افزایش می‌یابد[۲۱]. در بررسی‌ها در ارتباط با مکانیسم عمل L – هموآرژنین بیان کردند که احتمالاً این مهار کننده با ممانعت از عمل آنزیم مانع از شکستن سوبسترا توسط آنزیم فسفاتاز می‌گردد، بنابراین مکانیسم آنزیم و سوبسترا دچار اختلال می‌گردد و در نتیجه به عنوان مهار کننده آلکالین فسفاتاز معرفی شده است قابل ذکر است که این فعالیت آنزیم به صورت وابسته به L – هموآرژنین نمی باشد همچنین به صورت رقابتی نیز عمل نمی‌کند [۱۲]. در بررسی‌ها مشخص شده که کاهش پروتئین تام به دنبال کاهش میزان آلبومین در بیماری‌های کبدی، کلیوی، عفونت‌ها و یا بیماری‌های با اشکال در جذب و هضم پروتئین و افزایش آن در مواردی مانند لوسمی‌ها (سرطان خون) دیده شده است [۲۷]. در پژوهش حاضر تغییر غلظت در آلبومین و پروتئین تام مشاهده نگردید. در تفسیر بدون تغییر بودن پروتئین تام با توجه به تغییر نداشتن آلبومین طبیعی می‌باشد چون همانطور که ذکر شد کاهش پروتئین تام به دنبال کاهش آلبومین اتفاق می‌افتد. مطالعات نشان می‌دهد آنزیم‌های ALT و AST زمانی به گردش خون میریزند و میزان آنها زیاد می شود که غشای سلول‌های کبدی دچار آسیب شود [۱۳]. سطح ALT سرم به سرعت هنگام آسیب دیدگی کبد به دلیل التهاب کبد، سیروز کبدی، تومور کبد، یرقان انسدادی و یا سمی بودن کبد القاء شده توسط داروها یا سموم خارجی افزایش می‌یابد. در اغلب بیماری‌های کبدی افزایش سطح AST مشاهده می‌گردد [۸]. AST و ALT به طور طبیعی در انواع مختلف بافت‌ها از قبیل کبد، قلب، عضلات و مغز قرار دارند. این آنزیم‌ها در زمان آسیب به هر کدام از این بافت‌ها وارد خون می‌شوند. به عنوان مثال میزان غلظت سرمی آنها در هنگام حمله‌های قلبی و آسیب‌های عضلانی افزایش می‌یابد [۱۸]. AST وALT سرمی در نکروز سلول‌های کبدی یا افزایش نفوذپذیری غشا افزایش می‌یابند [۲۴]. در پژوهش انجام شده تغییرات فعالیت در آنزیم آلانین آمینوترانسفراز مشاهده نگردید اما آنزیم آسپارتات آمینوترانسفرازدارای افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بود.

در پژوهش حاضرطبق انتظار، در گروه تجربی ۱ که آلکالین فسفاتاز را دریافت کرده است افزایش معناداری در فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز مشاهده گردید که علت این امر می‌تواند به دلیل ذیل باشد: افزودن آنزیم آلکالین فسفاتاز به موش و لذا در اختیار قرار گرفتن میزان آنزیم بیشتر برای کاتالیز سوبستراهای موجود می‌باشد. انتظار می‌رود که در گروه دریافت کننده هموآرژنین تنها (تجربی۲) به عنوان مهار کننده آلکالین فسفاتاز، کاهش

معناداری در فعالیت آلکالین فسفاتاز مشاهده گردد. در گروه تجربی ۳ با توجه به این که مهار کننده و آنزیم هر دو تزریق شده است لذا انتظار می‌رود تغییری در فعالیت آنزیم مشاهده نشود که با نتایج نیز تطابق دارد. به عبارت دیگر این کاهش گرچه نسبت به گروه تجربی یک معنی-دار نیست اما در حدیست که در مقایسه با گروه کنترل فعالیت آلکالین فسفاتاز به حالت طبیعی بازگشته است. به عبارت دیگر اختلافی که بین گروه کنترل و تجربی یک به واسطه دریافت آنزیم مشاهده می‌گردد، در گروه تجربی سه نسبت به کنترل مشاهده نمی‌شود. این امر نشان دهنده مهار آنزیم اضافی تزریق شده توسط هموآرژنین است. همراهی دو آنزیم (AST و ALP) با افزایش در سطح، بدون افزایش سطح آنزیم ALT، نشان دهنده تخریب نسبی است [۷، ١٤، ١٩، ٢٢، ٢٣].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج پژوهش حاضر مشخص شد که آلکالین فسفاتاز باعث تخریب بافتی کبد می‌شود و L-هموآرژنین به عنوان مهارکننده فعالیت آلکالین فسفاتاز تا حدودی باعث کاهش عواض تزریق آلکالین فسفاتاز می‌شود، لذا پیشنهاد می‌گردد به منظور تعیین دقیق اثرات آنزیم آلکالین فسفاتاز و مهارکننده L- هموآرژنین مطالعات جامع‌تری صورت گیرد.

منابع

١- افشارنژاد، س.، معصوم، آ.، محمدی، م.، لطفی، م.، شهودی، ف. ١٣٨٩. بررسی سطح سرمی آنزیم‌های کبدی در معتادین مصرف کننده کریستال. علوم و فناوری زیستی مدرس، ١: ٦٩-٦١.

٢- جان کوئیرا، ک. ١٩٩٢. بافت‌شناسی پایه، ناشر شهر آب، صفحه,٤٣٢

٣- ریاحی، ح.، محمودان، آ. ١٣٧٤. راهنمای بالینی آزمایشهای تشخیص پزشکی. ناشر: موسسه فرهنگی انتشاراتی راستان، ٣٦-٣٥ صفحه.

٤- سخایی، ا.، قضاوی، ع.، هادی، ح.، مسیبی، ق. ١٣٨٧. اثر اولتراسوند متناوب بر میزان آلکالین فسفاتاز سرمی در روند جوش خوردگی تیبیای خرگوش نیوزیلندی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، ٤٢: ٦-١.

٥- کی، ج. ٢٠٠١. آزمایشهای تشخیص و آزمایشگاهی همراه با اقدامات پرستاری، موسسه فرهنگی انتشاراتی نور، ٦٤-١٠ صفحه.

6- Asmltrz S., Beer B., Hynkel J., Chyvyr K. (2011), Liver Endocrine/Surgical Nursing Bruner and Sydars. Publishing Community- Healthy, p: 14.

7- Bashir S., Sharma Y., Irshad M., Nag T.C., Tivari M., Kabra M. (2006), Arsenic induced apoptpsis in rat liver following repated 60 days exposure. *Toxicology*, 217(1): 63-70.

8- Berrahall A., Nehdi A., Hajjaji N. (2007), Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in a adult rats treated with load. *Comptes rendus Biologies*, 330(8): 581-588.

9- Blood D.C., Radostits O.M. (1989), Veterinary medicine. 7 td ed. London: Baillier and Tindal; pp: 228-298.

10- Burrtis C.A., Ash Wood E.R. (1999), Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Saunders Co, 617-716.

11- Cheung K.L., Ong Kl Fau-Wong L.Y.F. (1999), Elevated serum alkaline phosphatase and peripheral arterial disease in the United States national health and nutrition eamination survey -2004. *International Journal of Cardiology*, 135(2): 56-61.

12- Chi Wei L., William H.F. (1992), L-homo arginine: an organ-specific, uncompetitive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphohydrolases. *Journal of Biological Chemistry*, 247: 3082- 3087.

13- Daniel S., Marshal M. (2000), Evaluation of abnormal liver enzyme result in asymptomatic patients. *The New England Journal of Medicine*, 342(17): 11 266-271.

14- EL-Demerdash F.M. (2001), Effects of selenium mercury on the enzymatic activities and lipid proxidation in brain, liver and blood of rats. *Journal of Environmental Science and Health B*, 36(4): 489-499.

15- Fischbach F., Zawata B. (1992), Age-dependent reference limits of several enzymes in plasma at different measuring temperatures. *Klin Lab*, 38: 555-561.

16- Kaneko J. (1989), Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 4td ed. Academic Press Inc: 235-242.

17- Kirk R.W, Bistner S.I., Ford R.B., (1990), Hand book of veterinary. Procedures and emergency treament-5 td. Edition W.B. Saunders USA. pp: 9-11, 501, 735-766.

18- Knechtle B., Knechtle P., Mrazek C., Senn O., Rosemann T., Imoberdorf R. (2011), No effect of short-term amino acid supplementation on variables related to skeletal muscle damage in 100 km ultra-runners- a randomized controlled trial. J *International Society of Sports and Nutrition*, 8: 6.

19- Liu J., Liu Y., Habibbo S.M., Walkes M.P., Klassen C.D. (2000), Chronic combined exposure to cadmium and arsenic exacerbate nephrotoxicity particularly in methalothionenin I/II null mice. *Toxicology*, 147(3): 157-166.

20- Moss D.W., Henderson R. (1999), Clinical enzymology.In: Burtis CA, Ashwood ER. eds. Tietz textbook of clinical chemistry.3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company: 617-721.

21- Pratt D.S., Kaplan M.M. (2000), Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *The New England Journal of Medicine*, 342(17): 1266-1271.

22- Reed D.J. (1998), Evaluation of chemical-induced oxidative stress as a Mechanism of Hepatocyte Death. In PLaa GL, Hevitt Toxicology of the liver. 2nd ed. Taylor and Francis, Washington: DC, p. 187-220.

23- Sheikh Z.A., Vu T.T., Zaman K. (1999), Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154(3): 256-263.

24- Sidhu P., Garg M.L., Dhawan D.K., (2004), Role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chemical and Biological Interaction*, 150(2): 199-209.

25- Stephen Coburn P., Dennis Mahuren J., Jain M. (1998), Concentration of inorganic phosphate alkaline phosphatase (EC3.1.3.1) in serum is inhibited by physiological. *Journal of Clinical Enddocrinology and Metabolism*, 83(11): 3951-3957.

26- Thomas L. (1998), Clinical Laboratory Diagnostics. Frankfurt: TH-Books Veriagsgesell schaft, pp: 136-146.

27- Williams C.A., Singh G., Fries J.F. (1989), Toxic effects of azathioprin in rheumatoid arthritis: a national post marketing perspective. *Arthritis Rheumatoid*, 32: 837- 843.

28- Yorio M.A., Sembaj A., Sanaz E. (2000), Alkaline phosphatase isoenzymes for the diagnosis of metastatic tumors and lymphomas of bone. *Medicina*, 60: 311-315.