

تأثیر عصاره هیدروالکلی پوست میوه خربزه (*Cucumis melo* L.) بر جلوگیری ازکریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در *In vitro*مریم عیدی<sup>۱\*</sup>، مسیح بهار<sup>۲</sup>، اکرم عیدی<sup>۳</sup>، امید پویان<sup>۴</sup>، پونه شاه‌محمدی<sup>۵</sup>

- ۱- دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ورامین  
 ۲- دانشجوی دکتری ژنتیک انسانی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران  
 ۳- دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران  
 ۴- اورولوژیست، بخش اورولوژی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران  
 ۵- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین، ورامین  
 \*آدرس مکاتبه: تهران، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، صندوق پستی: ۱۶۵۳۵ - ۶۱۷  
 تلفن: ۲۲۲۶۹۵۵ (۰۲۹۲)  
 پست الکترونیک: maryameidi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۰

تاریخ تصویب: ۸۸/۶/۸

## چکیده

مقدمه: در طب سنتی ایران، گیاهان و روش‌های درمانی متعددی برای درمان سنگ‌های کلیوی وجود دارند، ولی هنوز هم تشکیل این سنگ‌ها و درمان آن از مشکلات مهم جامعه پزشکی و بیماران می‌باشند.

هدف: هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر عصاره هیدروالکلی پوست میوه خربزه<sup>۱</sup> بر جلوگیری از کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در شرایط *in vitro* بود.

روش بررسی: ابتدا عصاره هیدروالکلی پوست میوه خربزه در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. نمونه‌های ادرار شبانه از ۶ مرد بالغ (n=۶) که سابقه بیماری سنگ کلیوی نداشتند، سانتریفیوژ شدند. کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم با اضافه کردن اگزالات سدیم به نمونه‌های ادرار القاء شد. پس از اضافه کردن اگزالات سدیم، تعداد کریستال‌ها با استفاده از جذب نوری توسط اسپکتروفوتومتر و اندازه کریستال‌ها توسط کالیبره کردن عدسی چشمی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های کنترل (بدون عصاره گیاهی) و نمونه‌های تجربی (در حضور غلظت‌های مختلف عصاره گیاه) اندازه‌گیری شد.

نتایج: غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی پوست میوه خربزه موجب افزایش درصد کریستال‌های کوچک ۵-۲/۵ و ۹-۶ میکرونی و کاهش کریستال‌های بزرگ ۲۱-۱۷، ۳۰-۲۲ و ۴۰-۳۱ میکرونی می‌شود. از طرف دیگر، عصاره هیدروالکلی خربزه موجب افزایش کریستال‌های کوچک مونو هیدرات اگزالات کلسیم و کاهش کریستال‌های بزرگ مونو هیدرات اگزالات کلسیم شده است. همچنین، عصاره هیدروالکلی پوست خربزه موجب افزایش جذب و یا افزایش تعداد کریستال‌های اگزالات کلسیم شده است.

نتیجه‌گیری: تحقیق حاضر نشان داد عصاره هیدروالکلی پوست میوه خربزه با کاهش اندازه کریستال‌های اگزالات کلسیم موجب سهولت دفع آن‌ها توسط ادرار شده و احتمالاً مانع تشکیل هسته اولیه سنگ کلیوی می‌شود.

کل واژگان: پوست خربزه، اگزالات کلسیم، کریستالیزاسیون، ادرار

<sup>۱</sup> *Cucumis melo* L.

## مقدمه

درمان سنگ‌های کلیوی پیشنهاد شده [۹]، بر فرآیند کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم (در *in vitro*) در ادرار مورد بررسی قرار می‌دهد.

## مواد و روش‌ها

## جمع‌آوری و شناسایی گیاه

پوست میوه خربزه پس از شناسایی تاکسونومیکی از میوه جدا شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سایه، خشک و توسط آسیاب مکانیکی به پودر تبدیل شد. پودر خشک گیاه در کیسه‌های نایلونی تا زمان آزمایش در فریزر نگهداری شد.

## آماده‌سازی عصاره الکلی گیاه

۳۰ گرم از پودر پوست میوه خربزه با اتانل ۸۰ درصد مخلوط شد. سپس، مخلوط حاصل در دستگاه سوکسله قرار داده شد. عصاره به دست آمده ابتدا توسط فیلتر میکروپور صاف شده و سپس توسط روتاری خشک شد. در زمان آزمایش، عصاره گیاه با استفاده از آب مقطر در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آماده شد [۱۰].

## نمونه‌های ادراری

نمونه‌های ادرار شبانه از ۶ مرد بالغ که سابقه بیماری سنگ کلیوی نداشتند، تهیه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه و ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا نمونه‌های شفاف، فاقد سلول یا ذرات دیگر به دست آید که در مطالعه کریستال‌ها اختلال ایجاد ننماید. بخش رویی نمونه‌های ادراری جدا شده و هر نمونه به بخش‌های کنترل (بدون عصاره) و تجربی (اضافه کردن عصاره گیاه در غلظت‌های مختلف) تقسیم شدند [۱۰].

## القاء کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در نمونه‌های ادراری

با استفاده از محلول ۰/۱ مولار اگزالات سدیم، تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد در نمونه‌های ادراری کنترل و تجربی القاء شد [۱۰].

بیماری سنگ کلیه یک مشکل جهانی است و به نژاد، منطقه جغرافیایی و فرهنگ خاصی ارتباط ندارد [۱،۲]. اگر این بیماری درمان نشود، سرعت وقوع مجدد آن، در طی یک سال، تقریباً ۱۰ درصد، در مدت ۵ سال ۳۳ درصد و در ۱۰ سال ۱۰ درصد می‌باشد [۳]. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد متوسط شیوع سنگ‌های کلیوی در افراد مذکر بین ۷ تا ۱۵ درصد و در افراد مؤنث تنها بین ۳ تا ۶ درصد است [۴،۵،۶]. سنگ‌های اگزالات کلسیم خالص یا آنهایی که دارای فسفات کلسیم هستند، معمول‌ترند و علت تشکیل اکثریت آنها ناشناخته است. تشکیل سنگ اگزالات کلسیم<sup>۱</sup> از نظر بیماری‌زایی چندعاملی است و می‌توان آن را با فاکتورهای محیطی مثل آب و هوا، شغل، کشور یا محیط زیست، نژادهای مختلف و نیز فاکتورهای فیزیوشیمیایی مهمی که بر تشکیل سنگ‌های کلیوی اثر دارند، مرتبط دانست. تشکیل سنگ اگزالات کلسیم مراحل مختلف افزایش انباشته شدن اگزالات کلسیم و کلسیم فسفات و نوکلئاسیون، رشد کریستال و تجمع کریستال‌ها و ابقاء کریستال را در بر می‌گیرد [۷].

مطالعات نشان می‌دهد استفاده از گیاهان دارویی برای درمان سنگ کلیه سابقه دیرینه‌ای دارد. در طب سنتی ایران نیز از گیاهان دارویی زیادی برای دفع یا حل کردن سنگ‌های کلیوی و یا جلوگیری از تشکیل آن‌ها استفاده شده است [۸]. هر چند مکانیسم عمل بسیاری از آن‌ها هنوز به درستی روشن نشده است.

خربزه گیاهی از تیره کدویان<sup>۲</sup> است که بوته آن کوتاه و ساقه‌هایش روی زمین می‌خوابد. میوه آن گوشت‌دار، بزرگ متورم، مدور یا بیضوی و در نژادهایی که دارای میان‌بر نرم و آب‌دار است، اثر ملین دارد. خربزه اثر مدر دارد و از این نظر در دفع مواد زائد و رسوبات ادراری مؤثر واقع می‌شود [۹].

تاکنون گزارش دقیقی در مورد اثر این گیاه بر تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم ارایه نشده است. لذا، پژوهش حاضر اثر پوست میوه خربزه که در طب سنتی ایران برای

<sup>1</sup> Urolithiasis<sup>2</sup> Cucurbitaceae

واریانس یک طرفه بررسی شدند. مرز استنتاج آماری  $p < 0/05$  بود.

## نتایج

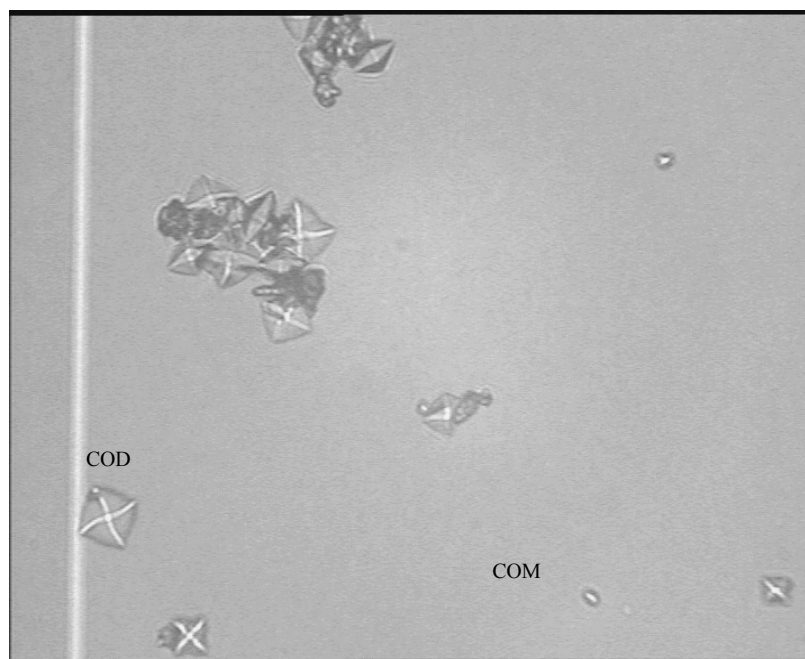
در پژوهش حاضر کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در شرایط عدم حضور عصاره گیاهی (کنترل) و در حضور غلظت‌های مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی پوست میوه خربزه مورد مقایسه قرار گرفتند. عصاره هیدروالکلی گیاه موجب افزایش درصد کریستال‌های کوچک ۵-۲/۵ و ۹-۶ میکرونی و کاهش کریستال‌های بزرگ ۲۱-۱۷، ۳۰-۲۲ و ۴۰-۳۱ میکرونی می‌شود. از طرف دیگر، عصاره هیدروالکلی خربزه موجب افزایش کریستال‌های کوچک مونو هیدرات اگزالات کلسیم و کاهش کریستال‌های بزرگ مونو هیدرات اگزالات کلسیم شده است (نمودار شماره ۱).

## مطالعه کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم

۱ ساعت پس از اضافه کردن اگزالات سدیم، تعداد کریستال‌ها با استفاده از جذب نوری توسط اسپکتروفوتومتر و اندازه کریستال‌ها توسط کالیبره کردن عدسی چشمی میکروسکوپ نوری در نمونه‌های کنترل (بدون عصاره گیاهی) و نمونه‌های تجربی (در حضور غلظت‌های مختلف عصاره گیاه) اندازه‌گیری شد. کریستال‌های مورد مطالعه بر دو نوع کریستال‌های بیضوی شکل مونو هیدرات اگزالات کلسیم (COM) و مربعی شکل دی هیدرات اگزالات کلسیم (COD) بودند. کریستال‌های COM بر دو نوع کوچک (۱ میکرون) و بزرگ (۵-۳ میکرون) بودند (۹) (شکل شماره ۱). کریستال‌های COD بر اساس قطر کریستال‌ها بر حسب میکرون در گروه‌های ۵-۲/۵، ۹-۶، ۱۶-۱۰، ۲۱-۱۷، ۳۰-۲۲ و ۴۰-۳۱ طبقه‌بندی شدند [۱۰].

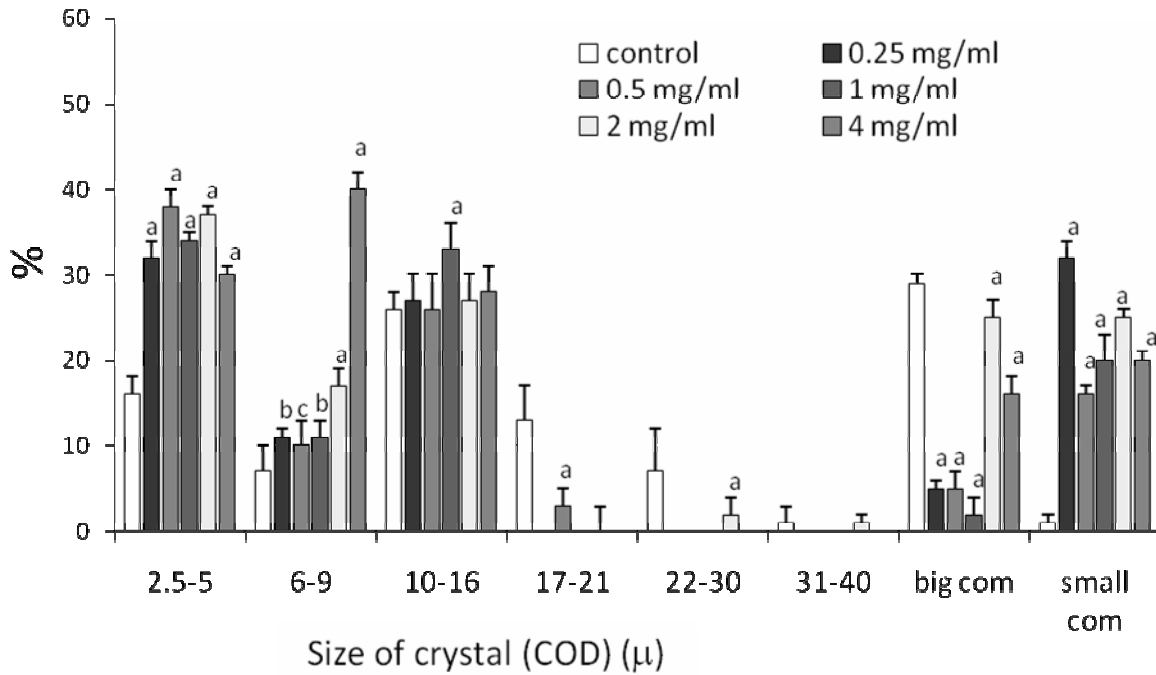
## آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده با استفاده از روش آماری آنالیز



شکل شماره ۱ - کریستال‌های بیضوی شکل مونو هیدرات اگزالات کلسیم (COM) و مربعی شکل دی هیدرات اگزالات کلسیم (COD)

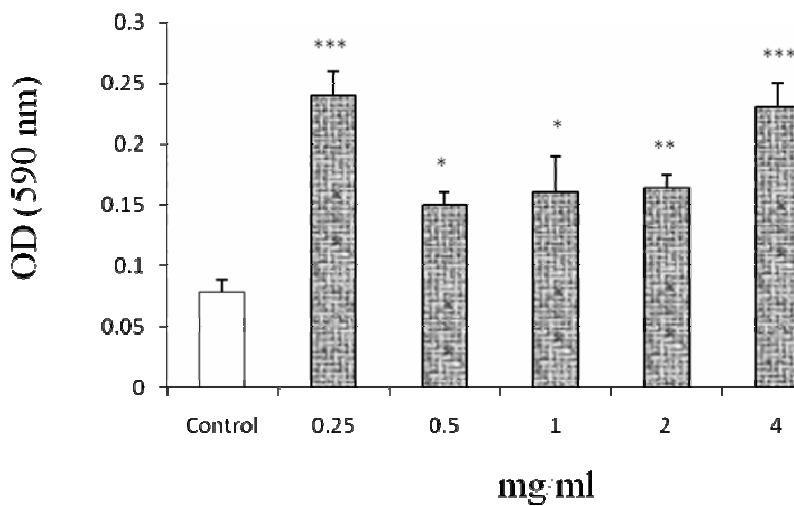




نمودار شماره ۱ - تاثیر عصاره هیدروالکلی پوست میوه خربزه بر قطر کریستال‌های اگزالات کلسیم.  $a, p < 0.001$ ,  $b, p < 0.01$ ,  $c, p < 0.05$  اختلاف از گروه کنترل را نشان می‌دهند. COM = مونوهیدرات اگزالات کلسیم، COD = دی‌هیدرات اگزالات کلسیم

عصاره هیدروالکلی پوست خربزه موجب افزایش جذب و یا افزایش تعداد کریستال‌های اگزالات کلسیم شده است (نمودار

شماره ۲).



نمودار شماره ۲ - تاثیر عصاره هیدروالکلی پوست میوه خربزه بر جذب نوری (OD<sub>590</sub>) نمونه‌های ادرار.  $***, p < 0.001$ ,  $** , p < 0.01$ ,  $* , p < 0.05$  اختلاف از کنترل را نشان می‌دهد



## بحث

گیاهان دارویی با عوارض جانبی کمتر و به دلیل طبیعی بودن، جایگزین‌های مناسبی برای داروهای شیمیایی بوده و در نواحی مختلف جهان کاربرد گسترده‌ای دارند. استفاده از گیاهان دارویی برای دفع یا حل نمودن سنگ‌های کلیوی از زمان قدیم متداول بوده و استفاده از آن‌ها به دلیل سهل‌الوصول و ارزان بودن، رو به افزایش است.

تحقیق حاضر به منظور بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی پوست میوه خربزه که در طب سنتی ایران برای درمان سنگ‌های کلیوی توصیه می‌شود [۸]، بر جلوگیری از کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در نمونه‌های ادراری در شرایط *in vitro* انجام گرفت. در پژوهش حاضر، سعی بر آن بوده است که آزمایش در شرایطی مشابه با محیط بدن مانند دما و بافر (سالین) انجام گیرد [۱۰].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پوست میوه خربزه موجب تشکیل کریستال‌های کوچک‌تر اگزالات کلسیم می‌شود که دفع این دسته از کریستال‌ها توسط جریان ادرار آسان‌تر می‌باشد. از طرف دیگر، این گیاه مانع بهم چسبیدن کریستال‌های اگزالات کلسیم و تشکیل هسته مرکزی سنگ‌های کلیوی می‌شوند. همچنین، فراوانی کریستال‌های مونوهیدرات اگزالات کلسیم را در مقایسه با کنترل افزایش می‌دهد، در حالی که در نمونه‌های کنترل، فراوانی کریستال‌های دی‌هیدرات اگزالات کلسیم بیشتر است. هرچند مکانیسم اثر پوست خربزه در جلوگیری از تشکیل کریستال‌های بزرگ هنوز مشخص نشده است، ولی این گیاه در طب سنتی ایران برای درمان سنگ کلیه توصیه می‌شود [۸].

بررسی‌های مشابهی در شرایط *in vitro* در مورد تشکیل سنگ‌های اگزالات کلسیمی انجام گرفته است. باروس<sup>۱</sup> و همکارانش نشان دادند گیاه *Phyllanthus niruri* در طب سنتی برزیل برای درمان سنگ کلیه استفاده می‌شود، موجب کاهش کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در شرایط *in vitro* می‌گردد [۱۰، ۱۱] میکالی<sup>۲</sup> و همکارانش نشان دادند گیاه

*Phyllanthus niruri* کارآیی دستگاه سنگ‌شکن را برای درمان سنگ‌های کلیوی افزایش می‌دهد [۱۲]. حضور موادی مانند منیزیم، سترات یا ماکرومولکول‌هایی مانند گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، استئوپونتین، نفروکالسن در ادرار مانع رشد کالکولوس می‌شود [۱۶-۱۳]. گیاه *Phyllanthus niruri* در دفع ادراری منیزیم، سترات یا گلیکوزآمینوگلیکان‌ها دخالت ندارد، بلکه جذب موادی را به‌داخل کالکولوس موجب می‌شود که ایجاد کالکولوس‌های کوچک‌تر و نرم‌تر می‌نماید [۱۷].

آتمانی<sup>۱</sup> و همکارش نشان دادند گیاه علف فتق کرک آلود<sup>۲</sup> موجب کاهش کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در *in vitro* می‌شود [۱۸]. همچنین، اثر این گیاه را در موش‌های صحرایی که به طور تجربی دارای سنگ کلیوی شده بودند، مشاهده کردند و نتیجه گرفتند این گیاه، اثر مهاری بر تشکیل سنگ‌های کلیوی دارد [۱۹].

فاروگ<sup>۳</sup> و همکارانش نشان دادند رژیم غذایی حاوی جلبک *Spirulina* کریستالیزاسیون اگزالات را در موش‌های صحرایی که غذای حاوی اگزالات زیاد را دریافت کردند کاهش می‌دهند [۲۰].

گوپتا<sup>۴</sup> و همکارانش گیاه *Crataeva adansonii* را برای جلوگیری از تشکیل سنگ‌های اگزالات کلسیمی در موش‌های صحرایی پیشنهاد کردند [۲۱]. آراینه<sup>۵</sup> و همکاران گیاه *Berberis vulgaris* [۲۲] و مکای<sup>۶</sup> و همکارانش گیاه *Mentha piperita* را برای درمان سنگ‌های کلیوی معرفی کردند [۲۳]. مطالعات آرتاگا<sup>۷</sup> و همکارانش نشان داد گیاه *Larrea tridentata* که در بیابان‌های مکزیک فراوان است در درمان سنگ کلیه موثر است [۲۴]. در طب سنتی Ayurveda و Unani گیاه *Dolichos biflorus* برای دفع سنگ‌های کلیوی کاربرد دارد [۲۵].

سونداراجان<sup>۸</sup> و همکارانش اثر گیاه *Aerva lanata* را بر تشکیل سنگ کلیوی در موش صحرایی بررسی کردند و نتیجه

<sup>1</sup> Atmani<sup>3</sup> Faroog<sup>5</sup> Arayne<sup>7</sup> Arteaga<sup>2</sup> *Herniaria hirsuta*<sup>4</sup> Gupta<sup>6</sup> McKay<sup>8</sup> Soundarajan<sup>1</sup> Barros<sup>2</sup> Micali

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی واحد ورامین - پیشوا به واسطه تامین بودجه لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین، از سرکار خانم نرگس میرالهی و جناب آقای غلام فاتح، کارشناسان محترم شرکت بهارافشان که در انجام پژوهش حاضر همکاری صمیمانه‌ای داشتند، سپاسگزاری می‌شود.

گرفتند این گیاه آنزیم‌های سنتزکننده اگزالات را کاهش می‌دهد [۲۶].

بنابراین، نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی پوست خربزه بر کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم موثر است و بایستی در درمان بیماری سنگ کلیه مورد بررسی دقیق‌تری قرار گیرد.

## منابع

1. Bichler KH, Strohmaier WL and Korn S. Urolithiasis in childhood. *Monatsschr Kinderheild* 1985; 133: 256 – 66.
2. Favazza T, Midha M, Martin J and Grob BM. Factor's influencing bladder stone formation in patients with spinal cord injury. *J. Spinal Cord Med.* 2004; 27: 252 – 54.
3. Uribarri J, Oh MS and Carroll HJ. The first kidney stone. *Ann. Intern. Med.* 1989; 111: 1006 – 9.
4. Ljunghall S. Renal stone disease. Studies of epidemiology and calcium metabolism. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 1977; 41: 1– 96.
5. Robertson WG, Peacock M and Baker M. Studies on the prevalence and epidemiology of urinary stone disease in men in Leeds. *Br. J. Urol.* 1983; 55: 595 – 8.
6. Parks JH and Coe FL. A urinary calcium-citrate index for the evaluation of nephrolithiasis. *Kidney Int.* 1986; 30: 85 – 90.
7. Basavaraj DR, Biyani CS, Browning AJ and Cartledge JJ. The role of urinary kidney stone inhibitors and promoters in the pathogenesis of calcium containing renal stones. *eau-ebu update series.* 2007; 5: 126 –36.
8. Safaei M. Summary of Iranian Medical Plants books. Chaharbagh Press, Iran. 2004, pp: 104 - 17.
9. Zargari A. Medicinal Plant, Tehran University Press, Iran, 1997, vol. 2. pp: 385 - 7.
10. Barros ME, Schor N and Boim MA. Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Urol. Res.* 2003; 30: 374 - 9.
11. Campos AH and Schor N. *Phyllanthus niruri* inhibits calcium oxalate endocytosis by renal tubular cells: Its role in urolithiasis. *Nephron.* 1999; 81: 393 – 4.
12. Micali S, Sighinolfi MC, Celia A, De Stefani S, Grande M, Cicero AF and Bianchi G. Can *Phyllanthus niruri* affect the efficacy of extracorporeal shock wave lithotripsy for renal stones? A Randomized, Prospective, Long-Term Study. *J. Urol.* 2006; 176: 1020 -2.
13. Coe FL, Parks JH and Nakagauwa Y. Inhibitors and promoters of calcium oxalate crystallization: their relationship to the pathogenesis and treatment of nephrolithiasis. In: Coe FL, Parks JH, Nakagauwa Y (eds) Disorders of bone and mineral metabolism. Raven Press, New York, 1992, pp: 757 - 8.
14. Dussol B and Berland Y. Urinary kidney stone inhibitors. What is new? *Urol. Int.* 1998; 60: 69-70.
15. Ryall RL, Harnett RM and Marshall VR. The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium of calcium crystals in vitro. *Clin. Chim. Acta.* 1981; 112: 349- 50.
16. Worcester EM. Inhibitors of stone formation. *Semin. Nephrol.* 1996; 5: 474-5.



17. Fretas AM, Carvente CT, Schor N and Boim MA. The effect of *Phyllanthus niruri* on urinary excretion of endogenous inhibitors of lithogenesis. In Rodgers AL, Hibbert BE, Hess B, Khan SR, Preminger GM (eds). Proceedings of Ninth International Symposium on Urolithiasis vol 1. Cape Town. 2000, pp: 183 - 4.
18. Atmani F and Khan SR. Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *BJU International*. 2000; 85: 621 - 5.
19. Atmani F, Slimani Y, Mimouni M, Aziz M, Hacht B and Ziyat A. Effect of aqueous extract from *Herniaria hirsuta* L. on experimentally nephrolithiasic rats. *J. Ethnophar*. 2004; 95: 87 - 93.
20. Farrog SM, Ebrahim AS, Asokan D, Sakthivel R, Savitha S, Rajesh NG and Varalakshmi P. Credentials of Spirulina diet on stability and flux related properties on the biomineralization process during oxalate mediated renal calcification in rats. *Clin. Nut*. 2005; 24: 932 - 42.
21. Gupta P, Patel N, Bhatt L, Zambare GN, Bodhankar SL, Jain BB and Nandakumar K. Anti-urolithiatic effect of petroleum ether extract stem bark of *Crataeva adansonii* in rats. *Pharmaceu. Boil*. 2006; 44: 160 - 5.
22. Arayne MS, Sultana N and Bahadur SS. The berberis story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. *Pakistan J. Pharmaceu. Sc*. 2007; 20: 83 - 92.
23. McKay DL and Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother. Res*. 2006; 20: 619 - 33.
24. Arteaga S, Andrade-Cetto A and Cardenas R. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J. Ethnophar*. 2005; 98: 231 - 9.
25. Gupta SK and Sharma PK. Review on phytochemical and pharmacological aspects of *Dolichos biflorus* Linn. *Asian J. Chem*. 2005; 17: 37 - 9.
26. Soundarajan P, Mahesh R, Ramesh T and Hazeena Begum V. Effect of *Aerva lanata* on calcium oxalate urolithiasis in rats. *Indian J. Exp. Biol*. 2006; 44: 981 - 6.

