

Malihe Farahani*Department of Microbiology
of Qom Branch, Islamic Azad
University, Qom, Iran*

Antiviral Effect Assay of Thymus Kotschyanus on HSV-1 Multiplication

Received: 25 Jun. 2016 ; Accepted: 1 Jul. 2017

Abstract

Background: Nowadays, the treatment of viral diseases such as Herpes simplex virus type 1 with chemical drugs is one challenge of medical knowledge due to the appearance of drug resistance in the virus. So, the need is for new antiviral drugs. In this regard, we can use the medicinal application of plants which has been found in human life lots. In this study, antiviral effect of Thymus kotschyanus plant was investigated on HSV-1 multiplication.

Methods: Thymus kotschyanus plant was extracted with decoction method to obtain aqueous extract. This extract was screened for its cytotoxicity on Hep-2 cell line by CPE assay at concentrations 50-1000 µg/ml. Antiviral properties of the plant extract was determined by cytopathic effect inhibition assay at one, two and three hours after inoculation of HSV-1.

Results: Thymus kotschyanus plant had not toxic effect at nontoxic concentrations to use. Findings indicated most antiviral effect of plant extract after an hour of virus inoculation that decreased at two and three hours.

Conclusion: Thymus kotschyanus extract exhibited very well antiviral effect on HSV-1 at nontoxic concentrations to use. Further research is needed to find effect mechanism of this plant which be used in conformation of antiviral drugs.

Keyword: Antiviral, Thymus kotschyanus, HSV-1

***Corresponding Author:**
Department of Microbiology of Qom
Branch, Islamic Azad University,
Qom, Iran

Tel: 086-32241127
E-mail: ami.airia@gmail.com

بررسی اثر ضدویروسی آویشن کوهی بر روی تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱

ملیحه فراهانی

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه
میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی
واحد قم، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۴/۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: امروزه درمان بیماری‌های ویروسی مانند ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ با داروهای شیمیایی به دلیل پیدایش مقاومت دارویی در ویروس یکی از چالش‌های دانش پزشکی است، پس‌نیاز به داروهای ضدویروسی نوین وجود دارد. در این باره می‌توان از گیاهان که کاربرد دارویی آن‌ها در زندگی انسان به فراوانی دیده می‌شود، بهره گرفت. در این پژوهش اثر ضدویروسی گیاه آویشن کوهی بر روی تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ بررسی شد.

مواد و روش‌ها: نخست عصاره آبی این گیاه با روش جوشاندن فراهم گردید و پس از سنجش سیتوتوکسیسیته آن بر روی دودمان یاخته‌ای (Hep-2 (Human epithelial type 2) با ارزیابی CPE (cytopathic effect) گیاه در غلظت‌های 50-1000µg/ml، اثر ضدویروسی عصاره گیاهی با روش Neutralization Test (NT) در غلظت‌های 50-800µg/ml در زمان‌های یک، دو و سه ساعت پس از تلقیح ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ بررسی گردید.

یافته‌ها: گیاه آویشن کوهی در غلظت‌های غیرتوکسیک خود اثر کشندگی بر روی یاخته‌ها نداشت. این گیاه بیش‌ترین ویژگی ضدهرپسی را یک ساعت پس از بردن ویروس بر روی یاخته‌های Hep-2 نشان داد که در دو و سه ساعت کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: عصاره آویشن کوهی اثر ضدویروسی بسیار خوبی بر روی تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ نشان داد. برای پیدا کردن مکانیسم اثر این دارو نیاز به پژوهش‌های بیش‌تر است تا در ساخت داروهای ضدویروسی به کار رود.

کلمات کلیدی: ضدویروسی، آویشن کوهی، هرپس سیمپلکس تیپ ۱

* نویسنده مسئول:

قم، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد
اسلامی واحد قم، ایران۰۸۶-۳۲۲۴۱۱۲۷
E-mail: ami.airia@gmail.com

مقدمه

آن جداگانه در دمای اتاق خشک گردید و سپس با آسیاب به صورت گرد درآورده شد. ۱۰۰ گرم از گرد گیاه به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد و برای ۱۰ دقیقه جوشانده شد و با کاغذ صافی ۰/۲۲ میکرون پالایه شد.^{۱۶،۱۵} عصاره پالایه شده در دستگاه فریزدرایر خشک گردید. از عصاره گیاهی یک محلول کاربردی با غلظت ۱۰۰۰ μg/ml در محیط کشت (Dulbecco's modified MEM Eaggel medium فراهم گردید و تا زمان آزمایش در یخچال نگهداری شد.^{۱۸،۱۷}

ویروس و یاخته

هرپس سیمپلکس ویروس تیپ ۱ سویه KOS به عنوان یک ویروس دارای ژنوم DNA دو رشته‌ای و دودمان یاخته‌ای Hep-2 برای کشت ویروس به کار برده شدند. یاخته‌های Hep-2 و ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ از آزمایشگاه‌های ویروس شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران فراهم گردید.

کشت ویروس

با فراهم کردن کشت یاخته‌ای Hep-2 با روش پاساژ دادن و بردن ویروس بر روی آن شمار بسیاری ویروس برای بررسی عیار ویروس به دست می‌آید. هنگامی که اثر سایتوپاتیک ویروس‌ها بیش از ۸۰٪ تک لایه یاخته‌ها را فراگرفت، ویروس‌ها برداشت شدند و سپس با روش (50% Tissue Culture Infective Dose) TCID50 عیار ویروس سنجیده شد.^{۱۹}

سنجش سیتوتوکسیسیته عصاره گیاهی روی یاخته Hep-2

نخست یاخته‌های Hep-2 در میکروپلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و پس از اینکه تک لایه کاملی از یاخته‌ها پدیدار شد، رقت‌های 50-1000 μg/ml از عصاره گیاهی آویشن کوهی در محیط کشت DMEM به یاخته‌ها افزوده گردید و در چاهک کنترل یاخته تنها محیط کشت ریخته شد. در پایان پلیت آماده شده در گرمخانه ۳۷°C گذاشته شد و تا یک هفته هر روز اثر سیتوتوکسیک عصاره گیاه به صورت CPE (آسیب یاخته‌ای) از دید ویژگی‌های میکروسکوپی یاخته‌ها بررسی گردید.

امروزه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ که از خانواده هرپس ویروس‌ها است به داروهای ضد هرپسی مانند آسیکلوویر به دلیل دوره نهفتگی همیشگی ویروس در بدن میزبان و برگشت بیماری مقاوم شده^{۲۰} و درمان بیماری‌های آن با چالش‌هایی روبرو است.^{۲۳} پس بایستی داروهای با کارایی بهتر یافت. در بررسی‌های بسیاری دیده شده که گیاهان سرشار از تانن‌ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها ویژگی‌های ضد ویروسی^{۷-۵} و ضد باکتری دارند.^{۹،۸} پژوهش‌های نوین نیز نشان داده است که گروهی از گیاهان دارویی اثرهای ضد هرپسی بر این ویروس دارند و می‌توانند از تکثیر آن پیشگیری کنند.^{۱۱،۱۰}

فرهنگ باستانی ایران هم در زمینه آشنایی و درمان با گیاهان دارویی پیشینه‌ای دیرینه دارد و دانشمندان ایرانی مانند ابوعلی سینا، زکریای رازی در پیشرفت و شکوفایی این دانش بسیار کوشیده‌اند.^{۱۲} بنابراین با بهره از دانش گذشتگان و یافته‌های کنکاش پژوهشگران امروزی درباره گیاهان می‌توان از ویژگی دارویی آن‌ها برای درمان بیماری‌های ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ بهره گرفت.^{۱۱،۷} پزشکان نامدار ایران مانند ابوعلی سینا آویشن کوهی را در درمان زگیل، درد مفاصل، بند آمدن پیشاب و نابودی کرم به کار می‌بردند. آویشن کوهی در پزشکی نوین یک خلط‌آور گندزدا، ضد سرفه، ضد آلرژی،^{۱۲} ضد سرطان، ضد قارچ، ضد کرم، کاهنده چربی و فشارخون و حشره‌کش است که برای درمان بیماری‌های پوستی مانند زونا،^{۱۳} بیماری قند، خوره، ضد ویروس و سیاه‌سرفه، سردردهای ناشی از سرماخوردگی کاربرد دارد.^{۱۴} در این پژوهش اثر ضد ویروسی گیاه آویشن کوهی گونه *kotschyanus* که بومی ایران است، در زمان‌های یک، دو و سه ساعت پس از تلقیح ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری گیاه

در این مطالعه پژوهشی گیاه آویشن کوهی گونه *kotschyanus* Thymus از بازار گیاهان دارویی شهر تهران خریداری گردید و به تایید کارشناس گیاه‌شناسی رسید. بخش ساقه‌های گل‌دار برگ‌های

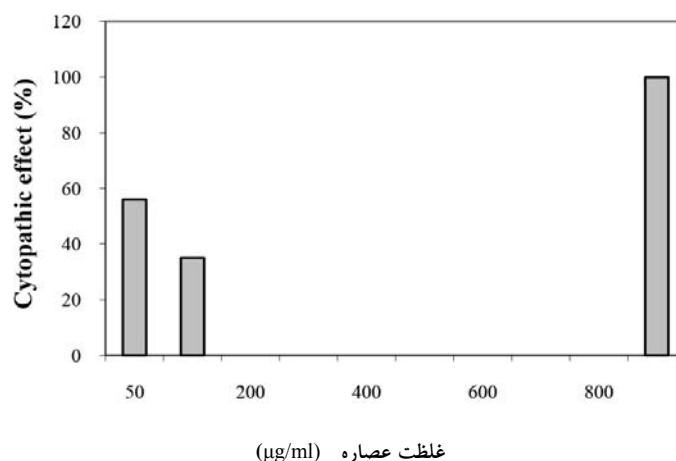
سنجش اثر ضد ویروسی عصاره گیاهی در زمان‌های گوناگون اثر دهی عصاره

نخست یاخته‌ها در میکروپلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و پس از اینکه تک لایه کاملی از یاخته‌ها پدیدار شد، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ بر روی کشت یاخته‌ای برده شد. در خانه کنترل یاخته تنها محیط کشت و در خانه کنترل ویروس، محیط کشت با ویروس ریخته شد. سپس رقت‌های 50-800 $\mu\text{g/ml}$ از عصاره گیاهی آویشن کوهی در زمان‌های یک ساعت، دو ساعت و سه ساعت اثر دهی عصاره پس از بردن ویروس بر روی یاخته‌ها به خانه‌ها افزوده گردید. در پایان پلیت آماده‌شده در گرمخانه 37°C گذاشته شد و برای ۳ روز تا یک هفته اثر ضد ویروسی عصاره با روش Neutralization Test (NT) به صورت بازدارندگی از CPE (cytopathic effect) ویروس، از دید ویژگی‌های میکروسکوپی یاخته‌های Hep-2 بررسی گردید. هرکدام از آزمایش‌ها در ۳ بار بررسی شد و داده‌های به دست آمده از پژوهش به کمک نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۷) ارزیابی گردید.

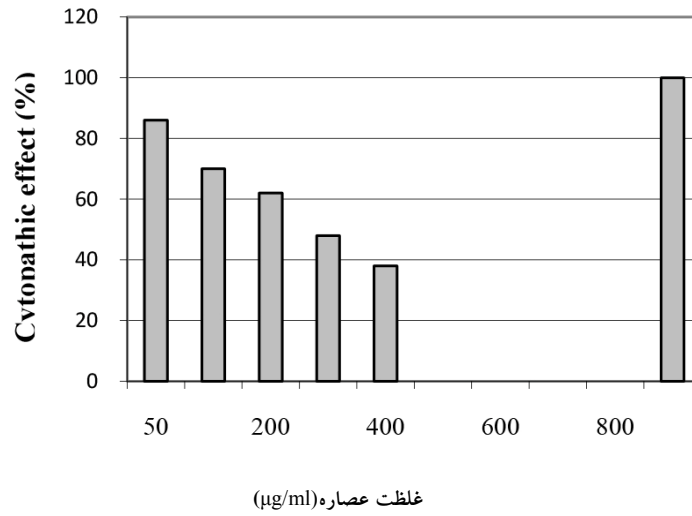
یافته‌ها

در بررسی سیتوکسیسیته عصاره گیاهی آویشن کوهی دیده شد که پس از یک هفته در غلظت‌های بیش از 800 $\mu\text{g/ml}$ بر روی یاخته‌ها کشنده بود. در آزمایش اثر ضدویروسی گیاه در زمان‌های

گوناگون اثردهی عصاره نشان داد که عصاره آویشن کوهی در غلظت‌های غیر توکسیک به کاررفته بر روی دودمان‌های یاخته‌ای اثر ضدویروسی بر روی تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ دارد. این ویژگی ضدهرپسی گیاه در زمان یک ساعت در بیش تر خانه‌های پلیت در غلظت‌های 200-800 $\mu\text{g/ml}$ دیده می‌شود و عصاره به خوبی توانسته است از تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ پیشگیری کند. تنها در دو چاهک دارای غلظت 50 و 100 $\mu\text{g/ml}$ عصاره گیاهی CPE ویروس پدیدار شده است (نمودار ۱). همچنین این اثر ضدویروسی عصاره گیاهی در زمان دو ساعت در نیمی از خانه‌ها (غلظت‌های 500-800 $\mu\text{g/ml}$) دیده شد (نمودار ۲) و در زمان سه ساعت گیاه در غلظت‌های کمتر از 700 $\mu\text{g/ml}$ بازدارنده تکثیر کامل ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ نبود و آسیب یاخته‌ای (CPE) رخ داد، ولی ویژگی ضدهرپسی آویشن کوهی در دو چاهک دارای غلظت‌های 700 و 800 $\mu\text{g/ml}$ عصاره دیده شد (نمودار ۳). بر پایه یافته‌های به دست آمده عصاره آویشن کوهی هنگامی بیشترین اثر را از خود نشان می‌دهد که یک ساعت پس از بردن ویروس بر روی یاخته‌ها به کار رود (جدول ۱). همچنین در این پژوهش نقش نگهدارندگی عصاره گیاهی برای یاخته Hep-2 در روز پایانی هفته آزمایش در زمان‌های یک ساعت و دو ساعت اثردهی عصاره دیده شد که در سه ساعت این نقش عصاره کم‌تر شده بود.



نمودار ۱: سنجش اثر ضدویروسی رقت‌های گوناگون عصاره آویشن کوهی در یک ساعت پس از تلقیح ویروس HSV-1

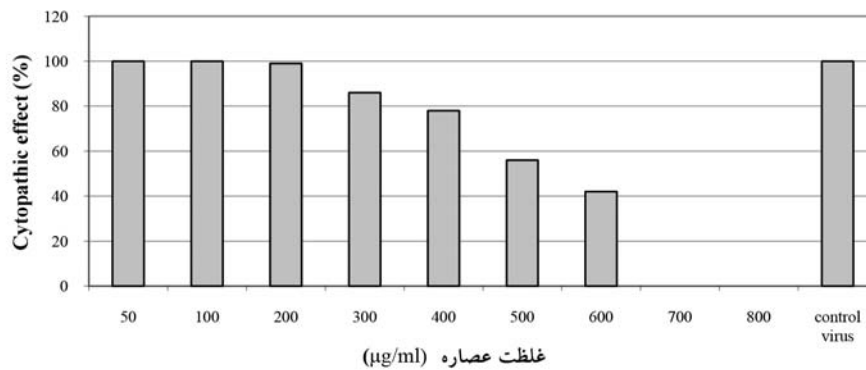


نمودار ۲: سنجش اثر ضدویروسی رقت‌های گوناگون عصاره آویشن کوهی در دو ساعت پس از تلقیح ویروس HSV-1

جدول ۱: بررسی اثر ضدویروسی عصاره آویشن کوهی بر روی HSV-1 (Herpes simplex virus type-1) در زمان‌های گوناگون اثر دهی عصاره

زمان اثر دهی عصاره	*800	*700	600*	*500	400*	*300	200*	100*	*50
یک ساعت	-	-	-	-	-	-	-	+	+
دو ساعت	-	-	-	-	+	+	+	+	+
سه ساعت	-	-	+	+	+	+	+	+	+

*غلظت عصاره بر پایه میکروگرم در میلی‌لیتر - دیده نشدن CPE (Cytopathic effect) ویروس +: دیده شدن CPE ویروس



نمودار ۳: سنجش اثر ضدویروسی رقت‌های گوناگون عصاره آویشن کوهی در سه ساعت پس از تلقیح ویروس HSV-1

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش گیاه آویشن کوهی در غلظت‌های 50-800 µg/ml بر روی دودمان‌های یاخته‌ای اثر ضدویروسی بسیار خوبی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ دارد و عصاره گیاهی در زمان یک ساعت در غلظت‌های بیش از ۱۰۰ µg/ml بازدارنده تکثیر کامل ویروس بود. هم‌چنین یافته‌های به‌دست‌آمده نشانگر کارایی عصاره آویشن کوهی در پیشگیری از تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ در زمان‌های دو ساعت و سه ساعت پس از بردن ویروس بر روی یاخته‌ها است که در زمان دو ساعت، اثر ضدهرپسی آن در خانه‌هایی با غلظت بیش از ۴۰۰ µg/ml نمایان بود. ولی در زمان سه ساعت، عصاره گیاهی نتوانست از تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ در غلظت‌های پایین‌تر از ۷۰۰ µg/ml پیشگیری کند. بر پایه داده‌های آزمایش عصاره گیاه آویشن کوهی در غلظت‌های 50-800 µg/ml هنگامی بیش‌ترین اثر را از خود نشان می‌دهد که یک ساعت پس از بردن ویروس بر کشت یاخته‌ای به کار رود (جدول ۱). هم‌چنین داده‌های نموداری نمایانگر افزایش بازدارندگی از تکثیر ویروس با افزایش غلظت عصاره گیاهی است. در پژوهشی اثر ضدویروسی عصاره آبی آویشن کوهی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و یک‌سویه مقاوم به آسیکلوویر (ACV(res) HSV-1) به‌وسیله Nolkemper و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بررسی گردید. بر پایه یافته‌های این گروه عصاره آبی آویشن کوهی می‌تواند در درمان آلودگی‌های برگشتی HSV-1 به‌صورت موضعی کاربرد داشته باشد.^{۲۰} درحالی‌که در پژوهش ما عصاره آبی آویشن کوهی اثر ضدویروسی خودش را با پیشگیری از تکثیر ویروس HSV-1 در کشت یاخته‌ای پس از جذب ویروس به یاخته‌های Hep-2 نشان داد و بیش‌ترین ویژگی را یک ساعت پس از بردن ویروس بر کشت Hep-2 داشت که بر پایه این یافته گیاه آویشن کوهی می‌تواند در پژوهش‌های بالینی برای بررسی بیش‌تر این ویژگی به‌کار برده شود. هم‌چنین در بررسی Schnitzler همکارانش بر روی سویه‌های مقاوم و حساس به آسیکلوویر HSV-1 با اسانس روغنی آویشن کوهی، اثر ویروس‌کشی بسیار

بالایی در سویه kOS حساس به دارو و سویه‌های مقاوم به آسیکلوویر دیده شد و ساخت پلاک هم در بیماران مقاوم به دارو کاهش یافته است که این ویژگی گیاه پیش از جذب ویروس به یاخته‌های RC-37 رخ داد.^{۲۱} در پژوهش دیگری اسانس روغنی گیاه آویشن کوهی را بر روی HSV-2 بررسی کردند و یافته‌ها نشانگر اثر ضدویروسی گیاه پیش از جذب ویروس بود، درحالی‌که در هنگام افزودن اسانس روغنی گیاه به یاخته‌های RC-۳۷ پیش از آلوده شدن به HSV-2 یا پس از دوره جذب ویروس این ویژگی دیده نشد.^{۲۲} هم‌چنین در این پژوهش ویژگی نگهدارندگی عصاره آویشن کوهی برای یاخته‌های Hep-2 در زمان‌های یک ساعت، دو ساعت اثر دهی عصاره پس از بردن ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ بر روی یاخته‌ها دیده شد که در زمان سه ساعت کاهش یافت و این یافته نشان‌دهنده آسیب کم‌تر یاخته‌های آلوده به ویروس است که این پدیده شاید اثر ضدهرپسی گیاه آویشن کوهی را بیش‌تر کند. در این پژوهش اثر ضدهرپسی بسیار خوبی از عصاره آبی گیاه آویشن کوهی بر روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ در غلظت‌های 200-800 µg/ml با پیشگیری از تکثیر کامل ویروس دیده شد و بیش‌ترین ویژگی را یک ساعت پس از بردن ویروس بر یاخته‌های Hep-2 داشت که در دو و سه ساعت کاهش یافت. یافته‌های پژوهش نشان داد درصد پیشگیری از تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ با افزایش غلظت عصاره گیاهی افزایش می‌یابد و می‌تواند امیدی تازه برای درمان بیماری‌های این ویروس که به درمان با داروهای امروزی مانند آسیکلوویر مقاوم شده است، باشد. برای پیدا کردن مکانیسم اثر این دارو نیاز به پژوهش‌های بیش‌تر است تا در ساخت داروهای ضدویروسی به کار رود.

سپاسگزاری

با سپاس فراوان از آقای دکتر همکار، آقای دکتر ضیایی و خانم دکتر طلعت مختاری آزاد مدیر گروه بخش ویروس‌شناسی دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که در این پژوهش، بسیار همکاری داشتند.

References

1. Frobert E, Ooka T, Cortay JC, Lina B, Thouvenot D, Morfin F. Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Mutations Associated with Resistance to Acyclovir: Antimicrob Agents Chemother. 2005 Mar; 49(3):1055-9.
2. Wozniak MA, Mee AP, Itzhaki RF. "Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques". J Pathol. 2009; 217 (1): 131-8.
3. Fatahzadeh M, Schwartz RA. "Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management". J. Am. Acad. Dermatol. 2007; 57 (5): 737-63; quiz 764-6.
4. Smith JS, Robinson NJ. "Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review". J. Infect. Dis. 2002; 86 Suppl 1: S3-28.
5. Yuan R, Lin Y. Traditional Chinese medicine: an approach to scientific proof and clinical validation. Pharmacology & Therapeutics. 2000; 86: 191-198.
6. Sindambiwe JB, Calomme M, Cos P, Totte J, Pieters L, Vlietinck A, et al. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. Journal of Ethnopharmacology, 1999; 65: 71-77
7. Isaacs CE, Wen GY, Xu W, Jia JH, Rohan L, Corbo C, et al. pigallocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes simplex virus. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52 (3):962-70.
8. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol. 2000 Feb;88(2):308/16.
9. Sydiskis RJ, Owen DG, Lohr JL, Rosler KH, Blomster RN. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. Antimicrob. Agents Chemother. 1991; 35: 2463-2466.
10. Pierce A. American Pharmaceutical Association Practical Guide to Natural Medicines. New York: Stonesong Press. 1999; P. 338-340.
11. Cseke LJ, Setzer WN, Vogler B, Kirakosyan A, Kaufman PB. Traditional, Analytical and Preparative Separations of Natural Products. CRC Press. 2006, pp. 264-317.
12. Zargari A. medicinal plants. Vol 3. Tehran: Tehran University Publications. 1996; p. 525- 534.
13. Rustaiyan A, Masoudi Sh, Monfared A, Kamalinejad M, Lajevardi T, Sedaghat S, et al. Volatile constituents of three Thymus species grown wild in Iran. Planta Med 66. 2000; 197-198.
14. Stahl-Biskup E, Saez F. Thyme (The Genus Thymus). CRC Press. September 2002. 354pp.
15. GardenGuides.com. Preparing Herbal Remedies. 2009. Available at: URL: <http://www.gardenguides.com/1442-preparing-herbal-remedies.html>.
16. Chanchal C. Delivery Systems and Dosage Strategies in Herbal Medicine. 2009. Available at: URL: <http://www.chanchalcabrera.com/delivery-systems-and-dosage-strategie>.
17. Jewell HYPERLINK "http://www.ehow.com/members/drjewell.html".S. How to Prepare Herbal Decoctions, Tinctures, Syrups ,eHow Expert in Health. 2009. Available at: URL: http://www.ehow.com/how_5051295_prepare-herbal-decoction-tinctures-syrups.html.
18. Yan X, Rana J, Chandra A, Vredevelde D, Ware H, Rebhun J, et al. Medicinal Herb Extraction Strategy - a Solvent Selection and Extraction Method Study. 2008. Available at: URL: <http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/aiche-2008/data/papers/P125270.pdf>
19. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. J Nat Prod. 1997 Jan; 60(1):52-60.
20. Nolkemper S ,Reichling J, Stintzing FC, Carle R, Schnitzler P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro, Planta Med. 2006 Dec;72(15):1378-82. Epub 2006 Nov 7.
21. Schnitzler P, Koch C, Reichling J. Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. Antimicrob Agents Chemother .2007; 51:1859-1862.
22. Koch C, Reichling J, Schnee J, Schnitzler P. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. Phytomedicine. 2008 Jan; 15(1-2):71-8.