

بررسی خاصیت آنتی باکتریال غشای آمینوتیک انسان در شرایط آزمایشگاهی

عبدالعزیز رستگار لاری^۱، محمد مهدی سلطان دلال^{۲،۳}، زهره کلافی^۴، سید کاظم حسینی^۵، سیامک حیدرزاده^۶، عباس رحیمی فروشانی^۷، روناک بختیاری^۸

۱. استاد، مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲. استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران تلفن: ۰۲۱-۸۹۹۲۹۷۱-۰۲۱ soltanirad34@yahoo.com
۳. مرکز تحقیقات میکروب شناسی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
۵. کارشناس ارشد میکروب شناسی، بانک پیوند اعضا ایران، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۶. دانشجوی دکتری میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۷. دانشیار گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۸. کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: غشای آمینوتیک داخلی ترین لایه از سه لایه ی تشکیل دهنده ی غشای جنینی می باشد. این غشاء از سه لایه تشکیل شده است. لایه ی اپی تلیال، غشای پایه و بافت همبند. غشای آمینوتیک دارای خاصیت ضد میکروبی به دلیل بیان mRNA الافین، HBD1-3 و مهار کننده های پروتئاز لوکوسیت ترشحی در اپی تلیال آن می باشد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر آنتی باکتریال غشای آمینوتیک انسان بر روی سویه های استاندارد باکتریایی سالمونلا انتریکا BAA-708، اشریشیا کلی ATCC 25922، سودوموناس آنروجینوزا ATCC 27853، کلبسیلا پنومونیه ATCC 7881، انتروکوکوس فکالیس ATCC 29212 در محیط آزمایشگاه می باشد.

روش بررسی: در یک مطالعه توصیفی، غشای آمینوتیک به صورت تازه از بانک پیوند اعضا بیمارستان امام خمینی (ق) شهر تهران تهیه شد. این غشاء مربوط به زنان بارداری بود که عمل سزارین انجام داده بودند و به لحاظ تست های HIV، HBV، HCV و سیفلیس منفی بودند. غشاء در اندازه های ۱/۵×۱/۵ cm تحت شرایط استریل برش داده شد و قطعات غشاء روی محیط های مولر هیتون آگار حاوی سوسپانسیون باکتریایی قرار گرفتند و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C نگهداری شدند.

یافته ها: خاصیت آنتی باکتریال غشای آمینوتیک بر رشد سالمونلا انتریکا و اشریشیا کلی با عدم پیدایش هاله به وضوح نشان داده شد، اما در سودوموناس آنروجینوزا هاله ی بسیار باریکی رویت شد. این هاله در کلبسیلا پنومونیه و انتروکوکوس فکالیس رویت نشد.

نتیجه گیری: غشای آمینوتیک دارای اثر ضد باکتری بر روی گستره خاصی از باکتری ها می باشد و با توجه به افزایش مقاومت های آنتی بیوتیکی، استفاده از این غشاء بر علیه باکتری های پاتوژن حائز اهمیت خواهد بود.

کلمات کلیدی: غشای آمینوتیک، سویه های استاندارد باکتریایی، اثر آنتی باکتریال، شرایط آزمایشگاه.

وصول مقاله: ۹۰/۹/۱۹ اصلاحیه نهایی: ۹۱/۳/۱۱ پذیرش: ۹۱/۶/۷

مقدمه

غشای جنینی شامل کوریون، آلتوتیوس و آمنیون می باشد (۱). غشای آمنیوتیک داخلی ترین لایه از سه لایه‌ی تشکیل دهنده‌ی غشای جنینی است (۲). غشایی شفاف و متشکل از یک لایه‌ی داخلی از سلول‌های اپی تلیالی است که بر روی غشای پایه قرار گرفته اند، غشای پایه نیز به نوبه‌ی خود توسط رشته‌هایی باریک به غشای نازکی از بافت همبند که دارای کلاژن‌های بینایی I، III، V می باشند، اتصال یافته است. لایه‌ی اپی تلیالی، یک لایه‌ی منفرد با سلول‌های مکعبی شکل تک هسته‌ای و تعدادی واکوئل‌های سیتوپلاسمی است. غشای پایه، نازک و دارای شبکه‌ی مشبک فیبری است (۳ و ۴). بافت همبند، بافت مزانشیمی و غیر عروقی است (۵) و در واقع از سه لایه تشکیل شده است: لایه‌ی فشرده پس از غشای پایه، لایه‌ی فیبروبلاستی و لایه‌ی اسفنجی. غشای آمنیوتیک ۰/۵ - ۰/۲ میلی متر ضخامت دارد و حفره‌ی آمنیوتیک را می پوشاند و سطح راسی داخلی آن در تماس با مایع آمنیوتیک است، در حالی که سطح خارجی در تماس مستقیم با غشای کوریون می باشد (۳). هیچ گونه عصب، عضله یا لنفی در آمنیون وجود ندارد (۵).

غشای آمنیوتیک به طور پراکنده از سال ۱۹۱۰ در موارد بالینی مختلف شامل: جراحی‌های داخل شکمی و ترمیمی و به عنوان پانسمانی برای سوختگی‌ها و زخم‌های مزمن به کار گرفته شده است (۶). غشاهای جنینی و جفت، منابع مهمی از پپتیدهای ضد میکروبی طبیعی در رحم هستند (۷). یافته‌های حاصل از مطالعات، حضور بتا دفتن‌سین‌های انسانی ۳- (HBD)، الافین، مهار کننده‌های پروتئاز لوکوسیتی ترشحی (SLPI) را در بافت آمنیون نشان می دهند. در زمان بارداری ضد میکروب‌های طبیعی در جفت، دوسیدا و غشاهای جنینی لوکالیزه می شوند (۸). در گذشته، هر دو آمنیون و کوریون اثر ممانعت کننده را روی رشد چندین سویه‌ی باکتریایی نشان داده اند و این امر تولید ضد

میکروب‌ها را به صورت اندوژن توسط این بافت‌ها اشکار می سازد (۷). Kjaergaard و همکاران از استرپتوکوک B جهت نشان دادن اثر غشای آمنیوتیک بر ضد عفونت استفاده کردند (۲).

مقاومت باکتریایی مشکلات و نیازهای درمانی را برای پزشکان در سراسر جهان ایجاد کرده است (۹). باکتری‌ها به طور فزاینده‌ای در حال تبدیل شدن به فرم مقاوم به داروهای رایجی که بر ضد آن‌ها استفاده می شوند، هستند (۱۰).

هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی مجدد اثر آنتی باکتریال غشای آمنیوتیک بر روی رشد سویه‌های استاندارد باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) به لحاظ طیف ضد باکتریایی آن‌ها می باشد. سویه‌های استاندارد سودوموناس آئروجینوزا (ATCC27853)، اشریشیا کلی (ATCC25922)، کلبسیلا پنومونیه (ATCC7881)، سالمونلا انتریکا (BAA-708) و اتروکوک فکالیس (ATCC29212) آزمایش شدند.

روش بررسی

نوع مطالعه توصیفی می باشد که در آذرماه ۱۳۸۹ در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردیده است. جفت انسان در مدت زمان کوتاهی پس از یک عمل سزارین انتخابی از خانم‌هایی که به لحاظ تست-های سرولوژی HIV، HBV، HCV و سیفلیس منفی بود، تهیه شد. سپس در زیر هود با جریان لاملار، جفت با نرمال سالین شستشو داده شد تا لخته‌های خون زدوده شوند. غشای آمنیوتیک داخلی از کوریون توسط بلانت کالبد شکافی جدا شد. غشای آمنیوتیک سه بار با فسفات بافرسالین (PBS) حاوی آنتی بیوتیک‌های کلواگزاسیلین ۵۰ μg/ml، استرپتومايسين 50 μg/ml و آمفو تریسین B به مقدار ۲/۵ μg/ml شستشو داده شد. بدین طریق عوامل میکروبی در طی عمل و پس از آن رفع شد. تست‌های

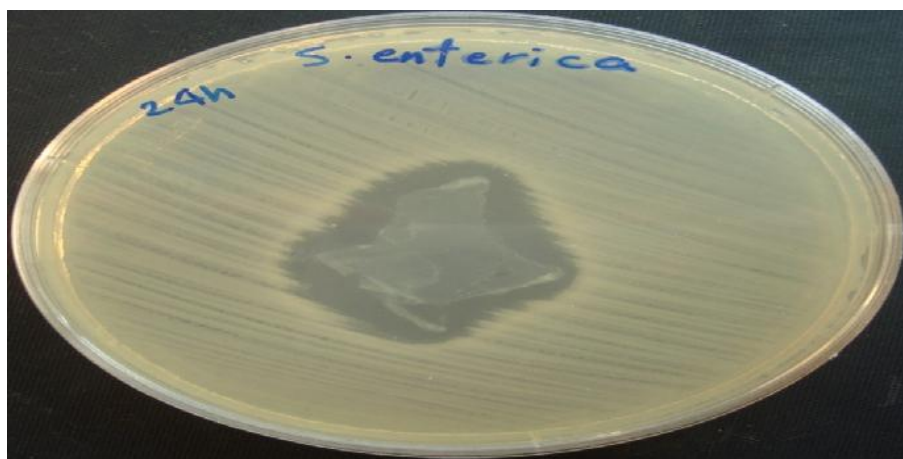
بررسی خاصیت آنتی باکتریال در روش دیسک فیوزن در تست آنتی بیوگرام). جهت تست عدم آلودگی غشاء آمینوتیک، یک قطعه از غشا بر روی محیط مولر هیتون آگار فاقد باکتری کشت شده قرار داده شد و جهت آزمون کنترل منفی و وجود اثر آنتی باکتریال و عدم خاصیت ممانعت کنندگی فیزیکی غشاء آمینوتیک، از غشای نیتروسولوزی استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در 37°C قرار داده شدند. اندازه‌ی ۴ قطر از هر هاله‌ی عدم رشد توسط خط کش اندازه گیری شد و میانگین اقطار توسط نرم افزار SPSS-11 محاسبه گردید.

یافته‌ها

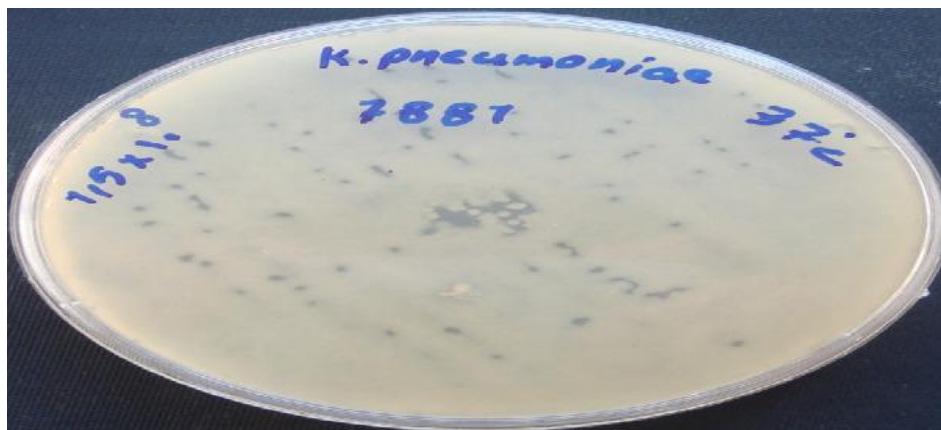
نتایج حاکی از اثر مهار رشدی غشاء بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی و سالمونلا انتریکا بود (تصویر ۱). در حالیکه هاله‌ی عدم رشد در رابطه با سودوموناس آئروجینوزا به سختی قابل رویت بود. در سویه‌های استاندارد کلبسیلا پنومونیه و انتروکوک فکالیس هاله‌ی عدم رشد وجود نداشت و کلنی‌ها در لبه‌های غشاء آمینوتیک نیز رشد کرده بودند (تصاویر ۲ و ۳). نتایج مربوط به اندازه میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد در سویه‌های مورد بررسی در جدول شماره ۱ درج گردید. در پلیت کنترل منفی کلنی‌ها در تمامی سطح پلیت حتی در زیر غشای نیتروسولوزی به چشم می‌خوردند و در پلیت مربوط به کنترل عدم آلودگی غشاء هیچ گونه کلنی میکروبی رویت نشد (تصاویر ۴ و ۵).

میکروب شناسی نیز بر روی غشاء صورت گرفت (۱۱). تمام این مراحل در بخش پیوند اعضای بیمارستان امام خمینی شهر تهران صورت گرفت. غشاء در یخدان (Cold Box) به آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل شد. تحت شرایط کاملاً استریل در زیر هود، غشاء به گونه‌ای که سطح اپی تلیالی آن به سمت بالا باشد بر روی غشاء نیتروسولوزی پهن شد و با نرمال سالین استریل شستشو داده شد و توسط قیچی جراحی به قطعات تقریبی $1/5 \times 1/5$ cm برش داده شد. لازم به ذکر است که به عنوان پیش آزمون و جهت حصول اطمینان از عدم اثر شستشوی اولیه غشای آمینوتیک با کوکتل آنتی بیوتیک، غشا به صورت کامل توسط نرمال سالین شستشو داده شد و نتیجه اثر آنتی باکتریال آن با غشای آمینوتیک بدون کوکتل آنتی بیوتیک مورد مقایسه قرار گرفت و با توجه به عدم مغایرت در نتیجه بدست آمده، از روش تیمار غشا توسط کوکتل آنتی بیوتیک در روند بررسی استفاده شد.

در مرحله‌ی بعد سویه‌ی استاندارد سودوموناس آئروجینوزا (ATCC27853) به صورت لیوفیلیزه از مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به تهران منتقل شد و در محیط BHI کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در 37°C انکوبه شد. سویه‌های انتروکوکوس فکالیس (ATCC29212)، کلبسیلا پنومونیه (ATCC7881)، سالمونلا انتریکا (BAA-708) و اشریشیاکلی (ATCC25922) از بخش میکروب شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران جمع آوری شد. هر ۵ سویه بر روی محیط بلاد آگار خون گوسفند ۵٪ کشت داده شد و پس از انکوباسیون از هر یک از آن‌ها سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. از هر یک از سوسپانسیون‌ها به صورت مجزا ۱۰۰ لاندا برداشته شد و بر روی محیط‌های مولر هیتون آگار (PH=۷/۵) ریخته شد و به صورت چمنی پخش شد و در مرکز هر یک از محیط‌ها یکی از قطعات غشای آمینوتیک قرار داده شد (شبهه به



تصویر ۱- هاله‌ی عدم رشد توسط غشای آمینوتیک بر روی سالمونلا انتریکا (ATCC29212) به قطر میانگین 63mm مشاهده می گردد.



تصویر ۲- عدم رویت هاله‌ی عدم رشد در کلیسیلا پنومونیه (ATCC7881)



تصویر ۳- عدم رویت هاله‌ی عدم رشد در انتروکوکوس فکالیس (ATCC25922).



تصویر ۴- کنترل غشاء آمینوتیک از نظر عدم آلودگی



تصویر ۵- کنترل منفی توسط غشاء نیتروسلولزی کلنی‌های باکتریایی در سراسر محیط کشت حتی در زیر غشای نیتروسلولزی مشاهده می‌گردند.

جدول ۱- اندازه‌ی هاله‌ی عدم رشد بر حسب میلی متر به طور میانگین در سویه‌های استاندارد باکتریایی

نام باکتری	سودوموناس آئروژینوزا	اشریشیا کلی	سالمونلا انتریکا	کلبسیلا پنومونیه	انتروکوک فکالیس
	27853	25922	BAA-708	7881	29212
اندازه‌ی هاله‌ی عدم رشد (mm)	۲	۵۰	۶۳	-	-

بحث

به طور قابل توجهی توسط عصاره‌ی جفت مهار شد (۱۶). در بررسی سال ۲۰۰۱ مربوط به Kjaergaard، قطر هاله‌ی ایجاد شده در اشیریشیا کلی ۱ mm گزارش گردید (۱۴). با توجه به این مطالعات، تفاوت در قطر هاله‌ی عدم رشد در اشیریشیا کلی اثر متفاوت غشاء را در سویه‌های مختلف از یک جنس نشان می‌دهد.

خصوصیات آنتی باکتریال در مایع آمینوتیک به اثبات رسیده است. مایع آمینوتیک حاوی لیزوزوم‌ها، ایمنوگلوبین‌های 7S، گلوبولین β_{1a} / β_{1c} و IgA می‌باشد (۱۷-۱۹). Walsh و همکاران توانایی مایع آمینوتیک را برای جلوگیری از رشد ۵ ایزوله‌ی باکتریایی شایع در واژن شامل استرپتوکوک گروه B و D، اشیریشیا کلی، کاندیدا آلیکنز و دیفتروئیدها را مورد مطالعه قرار دادند (۲۰). بر این اساس، غشاء آمینوتیک با دقت توسط نرمال سالین قبل از استفاده برای اجتناب از مایع آمینوتیک بر روی سطح غشاء شسته شد.

Talmi و همکاران اثر ممانعت کنندگی غشای آمینوتیک، غشای کوریو آمینوتیک و غشاهایی بر اساس پلی اورتان سنتتیک را زمانی که روی پلیت‌های آگاری کشت شده با باکتری قرار می‌گیرند، اثبات کرده‌اند. چسبندگی غشاها به سطح آگار و میکروارگانیسم‌ها نشان داده است که فاکتور مهمی در این مهار می‌باشد (۲۱). اثر غشاء روی میکروارگانیسم‌ها با کتریوسیدال به نظر می‌رسد (۱۶). در مطالعه‌ی ما غشای نیتروسولوز قرار گرفته با توجه به چسبندگی به سطح پلیت و باکتری کشت شده بر سطح آن، رشد باکتری‌ها را حتی در زیر سطح خود مهار نکرد.

در این مطالعه غشای آمینوتیک از فردی سالم با شرایط زایمان مناسب تهیه شد و با توجه به اثر آنتی باکتریال غشاء، این نکته حائز اهمیت است که زنان باردار و جنین آن‌ها مقاومت گسترده‌ای را در مقابل طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها دارند.

در گذشته، هردو آمینون و کوریون اثر مهارکنندگی را روی رشد چندین سویه‌ی باکتریایی نشان داده‌اند و این رخداد، تولید ضد میکروب‌های اندوژن را توسط این بافت-ها آشکار می‌سازد. هر دو، HBD-۱ و HBD-۳ به صورت mRNA در جفت بیان می‌شوند و پروتئین HBD-۳ در غشاهای جنینی حضور دارد (۷ و ۱۲).

HBD-۲ آنتی بیوتیکی قوی می‌باشد که توسط سلول‌های اپی تلیال آمینون در پاسخ به β -IL-۱ تولید می‌شود. بیان SLPI تحت تأثیر β -IL-۱ قرار نمی‌گیرد. HBDs در پاسخ به حضور سایتوکاین‌های پیش التهابی یا تولیدات باکتریایی وادار به تولید می‌شوند (۱۳).

این مطالعه اثر ممانعت کنندگی غشای آمینوتیک را بر روی یک گستره‌ی خاصی از سویه‌های استاندارد باکتریایی مورد بررسی شامل اشیریشیا کلی، سالمونلا انتریکا و سودوموناس آئروجینوزا نشان می‌دهد. Kjaergaard و همکاران در سال‌های ۱۹۹۹ و ۲۰۰۱ اثر آنتی باکتریال غشاء آمینوتیک را بر روی سویه‌های استرپتوکوک گروه A، استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیا کلی و سودوموناس آئروجینوزا مورد بررسی قرار داده بودند و مشاهده‌ی هاله‌ی عدم رشد توسط آن‌ها نیز تأیید کننده‌ی مشاهدات مطالعه‌ی ما در رابطه با اثر آنتی باکتریال غشاء آمینوتیک می‌باشد (۱۴ و ۱۵).

با توجه به نتایج حاصل، اثر مهار و آنتی باکتریال غشاء بر روی سالمونلا انتریکا و اشیریشیا کلی به صورت قابل توجهی بیشتر از سودوموناس آئروجینوزا بود. Kjaergaard و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز هاله‌ی عدم رشد باریکی را در سودوموناس آئروجینوزا نسبت به بقیه‌ی باکتری‌ها به واسطه‌ی عملکرد غشای آمینوتیک گزارش کردند (۱۴).

در مطالعه‌ی حاضر قطر هاله‌ی عدم رشد در سویه‌ی استاندارد E. coli (ATCC25922)، ۵۰ میلی متر اندازه گیری شد. در تحقیقی که توسط Mallick Road و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام شد، سویه‌ی E. coli DH5 α

استفاده‌ی بالینی از غشاء آمنیوتیک را به صورت جایگزین یا همراه با آنتی بیوتیک‌ها در امر درمان بیماری‌ها گسترش و تسریع می بخشد.

مطالعات آینده می توانند در بر گیرنده‌ی مکانیسم‌های اثر پپتیدهای ضد میکروبی غشاء بر روی میکروارگانیزم‌ها باشند.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۵۰۰/م ت مورخ ۱۳۸۹/۱۰/۱۵ می باشد و نویسندگان مقاله بدینوسیله از مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی تشکر و قدردانی می نمایند.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی اثر آنتی باکتریال غشاء آمنیوتیک بر روی سویه‌های استاندارد باکتریایی و مشاهده‌ی هاله‌ی عدم رشد در تعدادی از سویه‌ها، حاکی از وجود اثر ممانعت کنندگی این غشاء بافتی بر روی گستره‌ی خاصی از باکتری‌ها می باشد. مشاهده‌ی چنین نتایجی با توجه به گسترش روز افزون مقاومت‌های آنتی بیوتیکی

References

1. Barachetti L. Amniotic membrane transplantaio for ocular surface reconstruction in veterinary medicine. Doc Prog Vet Clin Sci 2009-2010; 9: 5-55.
2. Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan V S. Amniotic membrane in ophthalmology. Surve Ophthalmol 2004; 49: 51-78.
3. John T. Human amniotic membrane transplantation: Past, present, and future. Ophthalmol Clin N Am 2003; 16: 43-65.
4. Baradaran Rafiei AR, Aghayan HR, Arjmand B, Javadi MA, Barazandeh B. Amniotic membrane transplantation. Bina J Ophthalmol 2006; 11: 531-552.
5. Toda A, Okabe M, Yoshida T, Nikaido T. The potential amniotic membrane/amniotic derived cells for regeneration of various tissues. J Pharmacol Sci 2007; 105: 215-228.
6. Adds PJ, Hunt C, Hartely S. Bacterial contamination of amniotic membrane. Br J Ophthalmol 2001; 85: 228-230.
7. King AE, Paltoo A, Kelly RW, Sallenave JM, Bocking AD, Challis JRG. Expression of natural antimicrobials by human placenta and fetal membranes. Placenta 2007; 28: 161-169.
8. Stock SJ, Kelly RW, Riley SC, Calder AA. Natural antimicrobial production by the amnion. Am J Obstet Gynecol 2007; 196: 255- 261.
9. Levy SB. Antibiotic resistance: Consequences of inaction. Clin Infect Dis 2001; 33: 12-19.
10. Beumer R, Bloomfield SF, Exner M, Fara GM, Nath KJ, Scott E. Microbial resistance and biocides. IFH Rev 2000; 1-42.
11. Nejabat M, Masoumpour MB, Eghtedari M, Azarpira M, Ashraf MJ, Astane AR. Amniotic membrane transplantation for treatment of pseudomonas keratitis in experimental rabbits. IRCMJ 2009; 11: 149-154.
12. Jain S, Rastogi A. Evaluation of the outcome of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in symblepharon. Eye 2004; 18: 1251-1257.
13. Kim JS, Kim JC, Hahn TW, Park WC. Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer. Cornea 2001; 20: 720-726.

14. Kjaergaard N, Hein M, Hyttle L, Helmig RB, Schonheyder HC, Uldbjerg N and et al. Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 94: 224-229.
15. Kjaergaard N, Helming RB, Schonheyder HC. Chorioamniotic membranes constitute a competent barrier to group B streptococcus in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 83: 165-169.
16. Mallick Road RSC, Kolkata J. In vitro growth inhibition of microbes by human placental extract. *Curr Sci* 2005; 88: 782-787.
17. Thadepalli H, Bach VT, Davidson EC. Antimicrobial effect of amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 1978;52:198-204.
18. Cunha SP, Berezowski AT, Costa MW, Ribeiro SR, Duarte G. Demonstration of the presence of IgA in the human chorioamniotic membranes. *Int J Obstet Gynecol* 1984;22:107-110.
19. Schlievert P, Johnson W, Galask RP. Amniotic fluid antibacterial mechanisms: newer concepts. *Semin Perinatol* 1977;1:59-70.
20. Walsh H, Hildebrandt RJ, Prystowsky H: Growth inhibition factors in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1965;93:590-591.
21. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic. *Placenta* 1991;12: 285-288.