

Effects of Maternal Diabetes on rat's Offspring Plasma Ghrelin

Ghasem Ivar¹,
Zahra Ghiravani²,
Faezeh Rezaei¹,
Somayeh Yousefi³,
Erfan Lotfi⁴,
Mehran Hosseini⁵

¹ MSc in Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

² Lecturer, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

³ Lecturer, Department of Midwifery, Faculty of Nursing and Midwifery, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

⁴ Medical Student, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

⁵ MSc in Anatomical Sciences, Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

(Received December 11, 2017 ; Accepted June 2, 2018)

Abstract

Background and purpose: Ghrelin, a natural ligand of the growth hormone secretagogue receptor plays a major role in regulation of appetite, body fat mass, and energy balance in the body. The aim of this study was to evaluate the effects of maternal diabetes on circulatory ghrelin levels in rat newborns.

Materials and methods: In this experimental study, female Wistar rats were allocated into diabetic (n=20) and control (n=10) groups and mated with males. After parturition, 16 offspring (8 males) were collected at both postnatal days (P), P7 and P14. The body weight, blood glucose and plasma ghrelin levels were measured. Data were analyzed applying two-way ANOVA using sex and group as the factors in SPSS V22.

Results: At both P7 and P14, the body weight of newborns of diabetic mothers (18.49 ± 0.42 g, 22.27 ± 0.43 g respectively) were significantly lower ($P < 0.0001$ each) than those of the control group (22.34 ± 0.402 g, 30.32 ± 1.45 g) while there were no significant differences in blood glucose levels between the two groups. At P7, plasma ghrelin levels showed no significant difference between experimental and control groups, but at P14, experimental group had markedly higher ghrelin levels than that of the control group (29.25 ± 3.59 pg/ml vs. 14.81 ± 2.75 pg/ml; $P < 0.0001$). Moreover, at P14, male offspring had significantly higher level of ghrelin than female (29.87 ± 2.58 pg/ml vs. 22.62 ± 1.68 pg/ml; $P < 0.0001$).

Conclusion: Current results clearly demonstrate that diabetes during pregnancy can influence plasma ghrelin levels with male and female offspring responding differently.

Keywords: maternal diabetes, offspring, sexual dimorphism, ghrelin, rat

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (167): 171-176 (Persian).

* Corresponding Author: Mehran Hosseini - Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran (E-mail: mehranhosseini@yahoo.co.in)

تاثیر دیابت در دوران بارداری بر سطح پلاسمایی هورمون گرلین در نوزادن موش صحرایی

قاسم ایوار^۱
 زهرا قیروانی^۲
 فائزه رضایی^۱
 سمیه یوسفی^۳
 عرفان لطفی^۴
 مهران حسینی^۵

چکیده

سابقه و هدف: گرلین به عنوان یک لیگاند طبیعی برای گیرنده سلول‌های ترشح کننده هورمون رشد نقش مهمی را در تنظیم اشتها، توده چربی بدن و تعادل انرژی ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر دیابت دوران بارداری بر سطح پلاسمایی گرلین پس از تولد در نوزادان رت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، رت‌های ماده نژاد ویستار به دو گروه دیابتی ($n=20$) و کنترل ($n=10$) تقسیم شدند و مورد جفت اندازی قرار گرفتند. از هر گروه، ۱۶ نوزاد (۸ نر) در هر یک از روزهای ۷ و ۱۴ انتخاب شدند. پارامترهای وزن بدن، قند خون و غلظت گرلین فعال اندازه‌گیری شد. مقایسه داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (جنس*گروه) در محیط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد.

یافته‌ها: در ۷ و ۱۴ روزگی، میانگین وزنی نوزادان گروه دیابتی (به ترتیب $18/49 \pm 0/42$ و $22/27 \pm 0/43$ گرم) به طور معنی‌داری ($p < 0/001$ هر دو)، کم‌تر از گروه کنترل (به ترتیب $22/34 \pm 0/42$ و $30/32 \pm 1/45$ گرم) بود، در حالی که تفاوت معنی‌داری در قند خون بین گروه‌ها وجود نداشت. در ۷ روزگی، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها در سطح گرلین وجود نداشت، اما در ۱۴ روزگی، گروه دیابتی سطح گرلین بالاتری در قیاس با گروه کنترل داشت ($3/59 \pm 29/25$ pg/ml در مقابل $14/81 \pm 2/75$ pg/ml؛ $p < 0/001$). در همین زمان در گروه دیابتی سطح گرلین نوزادان نر به طور معنی‌داری بیش‌تر از جنس ماده بود ($29/87 \pm 2/58$ در مقابل $22/62 \pm 1/68$ ؛ $p < 0/001$).

استنتاج: نتایج این مطالعه به وضوح نشان می‌دهد که دیابت دوران بارداری می‌تواند در اثری وابسته به جنس، سطح گرلین پس از تولد را در نوزادان تحت تاثیر قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: دیابت بارداری، نوزادان، دیمورفسم جنسیتی، گرلین، رت

مقدمه

در حال حاضر، شاهد اپیدمی جهانی چاقی و دیابت هستیم و تاکنون تلاش‌های صورت گرفته در جهت مهار افزایش ابتلا به دیابت ناکام بوده است (۱). دیابت بارداری یکی از شایع‌ترین مشکلات پزشکی در دوران

E-mail: mehranhosseiny@yahoo.co.in

مؤلف مسئول: مهران حسینی - بیرجند: خیابان غفاری، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات طب تجربی

۱. کارشناس ارشد علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۲. مربی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۳. مربی، گروه مامایی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۴. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۵. کارشناس ارشد علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۱۲

سطح پلاسمایی هورمون گرلین در نوزادان متولد شده از مادران دیابتی وجود ندارد. بنابراین پژوهش حاضر با هدف تعیین تأثیر دیابت در دوران بارداری بر سطح پلاسمایی هورمون گرلین در دو هفته اول بعد از تولد نوزادان رت انجام گردید.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی از موش های صحرایی نژاد ویستار (هر دو جنس) با دامنه وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد (سیکل روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته، دسترسی آزاد به غذای حیوانات و آب شهری سالم و دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی گراد) و در قفس هایی از جنس پلی اتیلن نگهداری شدند. روش کار در این طرح، مطابق شرح پیش رو به تصویب کمیته اخلاق، معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بیرجند رسید (کد اخلاق: Ir.bums.rec.1396.208). جهت القای دیابت نوع یک از ماده استرپتوزوتوسین (شرکت سیگما آلدریچ-امریکا) با دوز ۴۵mg/kg حل شده در سالین سرد استفاده شد (۸). ۷۲ ساعت پس از تزریق، قند خون ناشتای موش ها توسط دستگاه قند خون جیبی (آکوا چک، آلمان) مورد سنجش قرار گرفت. قندخون ناشتای مساوی یا بیش تر از ۳۵۰mg/dL به عنوان دیابتیک پذیرفته شد (۹).

۲۰ سر رت ماده دیابتیک (گروه دیابتی) و ۱۰ سر رت غیر دیابتیک (گروه کنترل) در نظر گرفته شدند. سپس مورد جفت اندازی با موش ها نر سالم قرار گرفتند. با توجه به نتایج مطالعات قبلی، از آن جایی که شناس بارداری و زایمان موش های دیابتی کاهش می یابد، تعداد ۲۰ سر رت ماده برای گروه تجربی در نظر گرفته شد تا حداقل ۸ سر از آن ها باردار شده و زایمان موفق داشته باشند. بلافاصله بعد از تولد نوزادان، هر مادر از نظر تعداد و جنس همسان شدند (هر مادر، ۶ نوزاد) و هر رت به صورت انفرادی با نوزادان خود نگهداری شد. به دلیل این که دو هفته نخست پس از تولد در رت ها

حاملگی می باشد و مطالعات نشان می دهند که ۵ درصد حاملگی ها در انگلستان و تا بیش از ۲۵ درصد بارداری ها در کشورهای آسیایی را تحت تأثیر قرار می دهد (۲). از آن جایی که دیابت یک بیماری متابولیک است، فاکتورهای بیوشیمیایی متعددی نظیر سابتوکاین های التهابی، آدیپو کین ها و دیگر پروتئین های موجود در گردش خون در پژوهش های متعدد مورد بررسی قرار گرفته اند. با این حال تا کنون هیچ یک به عنوان عامل اختصاصی برای ایجاد دیابت، دیابت بارداری و یا سندرم متابولیک معرفی نشده اند (۳). از این رو روند تحقیقات بر روی طیف وسیع شاخص های زیستی و دیابت هم چنان در جریان می باشد. یک سری از اختلالات نظیر چاقی، مقاومت به انسولین، پرفشاری خون و اختلال تحمل گلوکز تمایل داشته که همزمان با هم در یک فرد بروز نمایند؛ از این رو دانشمندان به دنبال یافتن عامل یا عوامل مشترک مرتبط با این اختلالات بوده و هستند و در این راستا شماری از پپتیدهای مرتبط با چاقی و سندروم متابولیک اخیراً شناخته شده اند (۴). یکی از این مولکول ها، گرلین نام دارد که به عنوان یک سیگنال محرک اشتها از سوی روده به مغز در گردش خون ارسال می شود و کارآیی های مختلفی چون عملکرد هورمونی، متابولیسمی و نقش در سیستم قلبی-عروقی و سیستم ایمنی برای آن پیشنهاد شده است (۵). گرلین یک پپتید ۲۸ آمینواسیدی است که از معده و روده کوچک ترشح می شود و نقش مهمی در تعادل انرژی، چاقی و رفتار دریافت غذا ایفا می کند (۶). بنابراین این هورمون نقش موثری در رشد و متابولیسم سلول ها دارد. از آن جایی که دیابت در دوران بارداری یک اختلال متابولیکی است و هم چنین مطالعات پیشین نشان دهنده این مطلب می باشند که دیابت بارداری، سطح پلاسمایی و سرمی هورمون ها را در مادر تغییر می دهد (۷)، اندازه گیری تغییرات هورمون گرلین در نوزادان متولد شده از مادران دیابتی می تواند جهت یافتن مسیر ارتباط عوارض دیابت بارداری مفید باشد. با این حال مطالعه ای با عنوان بررسی

از نظر تکاملی معادل سه ماهه سوم بارداری در انسان می‌باشد، در روزهای هفتم و چهاردهم پس از تولد، نوزادان پس از توزین مورد خونگیری قرار گرفتند (۱۰). در هر یک از روزهای ۷ و ۱۴ از هر گروه ۱۶ نوزاد (۸ سر نر و ۸ سر ماده از مادرهای مختلف) انتخاب شدند و پس از بیهوشی عمیق با دی‌اتیل اتر مورد خونگیری قلبی قرار گرفتند. نمونه‌های خون به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد و پلازما جدا شد. سنجش قند خون با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر (هیتاچی ۹۱۲، ژاپن) و کیت استاندارد (بیونیک ۳۱۴۱۸۰۸، ایران) انجام گرفت. خوانش غلظت پلاسمایی گرلین با استفاده از کیت الایزا (KA1863، شرکت آبنوا، تایوان) و خوانشگر میکروپلیت (بیوتک، آمریکا) انجام شد. مقایسه قند خون مادران با استفاده از آزمون تی-تست انجام شد. جهت بررسی اثر جنسیت بر پارامترهای یاد شده در گروه‌ها از آزمون آنالیز وریانس دو طرفه و در صورت وجود تاثیر جداگانه و یا مشترک از پس آزمون توکی استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS و پیرایش ۲۲ استفاده شد و اختلافات در سطح $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها و بحث

مقایسه میانگین قند خون دوران بارداری گروه‌ها با یکدیگر هم در ابتدای بارداری و هم در روز آخر بارداری نشان داد که گروه دیابتی به طور معنی‌داری ($p < 0/0001$) قند خون بیش تری در مقایسه با گروه کنترل در هر دو بازه زمانی داشت. مقایسه قند خون نوزادان هم در هفت روزگی ($p = 0/18$) و هم در ۱۴ روزگی ($p = 0/83$) تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان نداد (جدول شماره ۱).

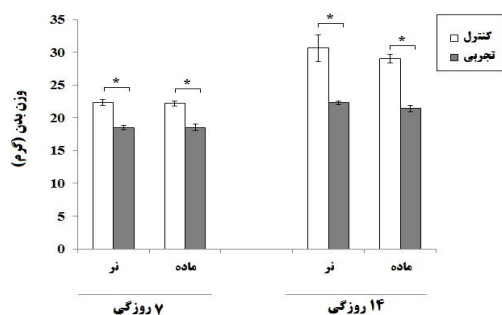
در هفت روزگی، میانگین وزن نوزادان متولد شده از مادران دیابتی ($18/49 \pm 0/42$ گرم) در مقایسه با نوزادان متولد شده از مادران سالم ($22/27 \pm 0/43$ گرم) به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود ($F(1,28) = 137/70$; $p < 0/0001$). اما این اثر وابسته به جنس نبود ($F(1,28) = 0/42$; $p = 0/83$).

در روز چهاردهم پس از تولد نیز نوزادان متعلق به گروه دیابتی میانگین وزن کم‌تری ($0/402 \pm 22/34$ گرم) در مقایسه با گروه کنترل ($1/45 \pm 30/32$ گرم) داشتند (نمودار شماره ۱) که این اختلاف نیز از نظر آماری معنی‌دار بود [$F(1,28) = 243/45$; $p < 0/0001$]. با این حال هم چنان این اثر وابسته به جنس نبود ($p = 0/52$); $F(1,28) = 0/41$. ماکروزومی یا بالا بودن بیش از حد وزن نوزادان، یکی از عوارض شایع دیابت حاملگی است (۱۱). البته برخلاف انسان، نوزادان موش‌های مبتلا به دیابت حاملگی غالباً وزن هنگام تولد کم‌تری دارند (۱۲). دلایل مختلفی تا کنون جهت توجیه این اختلاف مطرح شده‌اند که می‌توان به پائین‌تر بودن دوره بارداری رت در مقایسه با انسان، اختلاف بین توده چربی جنین رت (۱ درصد) با جنین انسان (حدود ۱۶ درصد) و هم‌چنین الگوی رشد وزنی بیش‌تر نوزاد انسان در مقابل نوزاد رت در دوران بارداری اشاره نمود (۱۳).

جدول شماره ۱: میانگین \pm انحراف معیار قند خون دوران بارداری و قند خون نوزادان گروه‌های تجربی و کنترل

گروه‌ها	قند خون مادران (mg/dl)	قند خون نوزادان (mg/dl)
روز اول بارداری	روز اول بارداری (روز ۲۱)	روز ۱۴ روزگی
گروه کنترل	$98/14 \pm 7/21$ (n=10)	$106/23 \pm 6/19$ (n=9)
گروه تجربی	$539/16 \pm 83/27$ (n=20)	$113/75 \pm 7/47$ (n=16)
	$115/27 \pm 15/62$ (n=16)	$110/87 \pm 8/67$ (n=16)

* تفاوت معنی‌دار ($p < 0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین وزن نوزادان متولد شده از مادران سالم (کنترل) و یا دیابتی (تجربی) بر اساس جنسیت، در روزهای ۷ و ۱۴ پس از تولد. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار برای هر ۱۶ سر نوزاد رت (از هر جنس ۸ سر) برای هر گروه ارائه شده است. * نشانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/05$ می‌باشد.

مطالعه Ng و همکاران نشان داد که در بدو تولد، نوزادان متولد شده از مادران دیابتی سطح پلاسمایی گرلین کم تری ($p=0/033$) در مقایسه با نوزادان متعلق به مادران غیر دیابتی داشتند، اما تفاوت معنی داری در وزن نوزادان بین گروه ها وجود نداشت و سطح گرلین نوزادان ماده بیش تر از نوزادان نر بود (۱۴). در مطالعه دیگری که سطح گرلین بند ناف ۱۲۳ نوزاد مورد بررسی قرار گرفت، در نوزادانی که دچار محدودیت رشد و وزن کم تر هنگام تولد بودند، سطح این هورمون غیر وابسته به جنس به طور معنی داری بیش تر بود (۱۵). در یک مطالعه جدیدتر که توسط Karakulak و همکارانشان بر روی ۶۰ نمونه خون بند ناف نوزادان متعلق به مادران دیابتی و ۶۴ نمونه کنترل انجام شده است، نشان داده شد که در مادران دیابتی، میزان گرلین بند ناف به طور معنی داری کم تر از مادران سالم است، در حالی که وزن نوزادان آن ها بیش تر بود (۱۶).

یافته های این مطالعه برای اولین بار نشان می دهد در مدل حیوانی القای دیابت بارداری که در تحقیقات بسیاری مورد استفاده قرار می گیرد، سطح پلاسمایی گرلین نوزادان پس از تولد دچار افزایش معنی داری می شود.

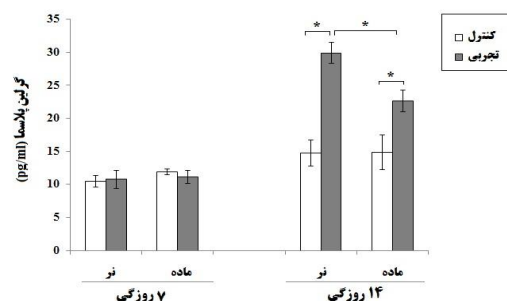
سپاسگزاری

مطالعه حاضر حاصل بخشی از یافته های طرح تحقیقاتی مصوب (۴۶۵۴) مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند می باشد. پژوهشگران مراتب قدردانی خود را از ریاست محترم مرکز تحقیقات طب تجربی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند که تحقیقات روی حیوان آزمایشگاهی در آن مرکز صورت پذیرفت را ابراز می دارند.

References

- Herman WH. The global agenda for the prevention of type 2 diabetes. *Nutr Rev* 2017; 75(suppl_1): 13-18.
- Tutino GE, Tam WH, Yang X, Chan JC, Lao TT, Ma RC. Diabetes and pregnancy: perspectives from Asia. *Diabet Med* 2014; 31(3): 302-318.

میانگین و انحراف معیار غلظت پلاسمایی فرم فعال گرلین در نمودار شماره ۲ ارائه شده است. مقایسه غلظت این هورمون در روز هفتم پس از تولد نشان داد که بین گروه دیابتی ($10/93 \pm 0/68$ پیکوگرم/میلی لیتر) و گروه کنترل ($11/18 \pm 1/16$ پیکوگرم/میلی لیتر) تفاوت معنی داری وجود نداشت ($p=0/88$). با این حال در روز چهاردهم پس از تولد، میانگین هورمون گرلین در نوزادان گروه دیابتی ($29/25 \pm 3/59$ پیکوگرم/میلی لیتر) به طور معنی داری بیش تر از گروه کنترل ($14/81 \pm 2/75$ پیکوگرم/میلی لیتر) بود ($p<0/0001$). هم چنین متغیر جنسیت بر میانگین هورمون گرلین نیز معنی دار بود ($F(1,28)=808/49$; $p<0/0001$) و برهمکنش گروه*جنسیت نیز معنی دار بود ($F(1,28)=75/22$; $p<0/0001$). در روز ۱۴ پس از تولد، نوزادان نر متعلق به گروه دیابتی میانگین گرلین پلاسمایی بیش تری در قیاس با نوزادان ماده همان گروه داشتند ($p<0/0001$).



نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین گرلین استیله (فرم فعال) نوزادان متولد شده از مادران سالم (کنترل) و یا دیابتی (تجربی) براساس جنسیت، در روزهای ۷ و ۱۴ پس از تولد. مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار برای هر ۱۶ سر نوزاد رت (از هر جنس ۸ سر) برای هر گروه ارائه شده است. * نشانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح $p<0/05$ می باشد

3. Bao W, Baecker A, Song Y, Kiely M, Liu S, Zhang C. Adipokine levels during the first or early second trimester of pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Metabolism*. 2015; 64(6): 756-764.
4. Ukkola O. Ghrelin in Type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 340(1): 26-28.
5. Nass R, Gaylinn BD, Thorner MO. The ghrelin axis in disease: Potential therapeutic indications. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 340(1): 106-110.
6. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(10): 4753-4758.
7. Gómez-Díaz RA, Gómez-Medina MP, Ramírez-Soriano E, López-Robles L, Aguilar-Salinas CA, Saucedo R, et al. Lower Plasma Ghrelin Levels are Found in Women with Diabetes-Complicated Pregnancies. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2016; 8(4): 425-431.
8. Hami J, Vafaei-nezhad S, Ghaemi K, Sadeghi A, Ivar G, Shojae F, et al. Stereological study of the effects of maternal diabetes on cerebellar cortex development in rat. *Metab Brain Dis* 2016; 31(3):643-652.
9. Serki E, Vazifeshenas Darmiyan K, Ezi S, Bayat J, Shahamat F, Ghiravani Z, et al. Effects of Colostrum on Sperm Parameters, Sex Hormones and Testes Histopathological Changes in Diabetic Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2016; 26(141): 83-94 (Persian)
10. Lotfi N, Hami J, Hosseini M, Haghiri D, Haghiri H. Diabetes during pregnancy enhanced neuronal death in the hippocampus of rat offspring. *Int J Dev Neurosci* 2016; 51: 28-35.
11. Berggren EK, Stuebe AM, Boggess KA. Excess maternal weight gain and large for gestational age risk among women with gestational diabetes. *Am J Perinatol* 2015; 32(03): 251-256.
12. Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, Takaku M, Takeno MA, Rudge MV, et al. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr* 2009; 1(1): 21.
13. Kervran A, Guillaume M, Jost A. The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia* 1978; 15(5): 387-393.
14. Ng P, Lee C, Lam C, Wong E, Chan I, Fok T. Plasma ghrelin and resistin concentrations are suppressed in infants of insulin-dependent diabetic mothers. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11): 5563-5568.
15. Farquhar J, Heiman M, Wong AC, Wach R, Chessex P, Chanoine JP. Elevated umbilical cord ghrelin concentrations in small for gestational age neonates. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(9): 4324-4327.
16. Karakulak M, Saygili U, Temur M, Yilmaz Ö, Özün Özbay P, Calan M, et al. Comparison of umbilical cord ghrelin concentrations in full-term pregnant women with or without gestational diabetes. *Endocr Res* 2017; 42(2): 79-85.