

بررسی اثر ضدافسردگی قطره گل سرخ (*Rosa Damascena*) در موش‌های آزمایشگاهی (مطالعه تجربی بی‌خبر با گروه شاهد)

کیوان

داوود فرزین (Ph.D.)**

مهران ضرغامی (M.D.)*

باقری (M.D.)***

چکیده

سابقه و هدف : افسردگی یکی از شایع‌ترین اختلالات روانپزشکی است که منجر به عوارض شایان توجهی برای قشر فعال جامعه می‌شود. در متون سنتی به اثرات ضدافسردگی گل سرخ اشاره شده است، ولی تاکنون تحقیق علمی در این زمینه انجام نشده است. هدف مطالعه حاضر تعیین اثرات ضدافسردگی این گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها : این مطالعه بر روی موش‌های آزمایشگاهی با آزمون‌های اجباری انجام شد و اثرات گل سرخ با غلظت‌های مختلف با اثرات دارونما و آمفتامین مقایسه گردید.

یافته‌ها : قطره گل سرخ با غلظت ۵ درصد فاقد اثر ضدافسردگی بود، ولی غلظت‌های ۱۰ درصد، ۲۰ درصد و ۴۰ درصد به طور معنی‌داری در مقایسه با دارونما افسردگی را کاهش داد که مشابه تأثیر آمفتامین بود.

استنتاج : نظر به این که اثر ضدافسردگی قطره گل سرخ مانند آمفتامین به صورت حاد و با فاصله کم ظاهر شده است، احتمالاً این تأثیر ناشی از تغییر آزادسازی نورآمین‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : افسردگی، گل سرخ، آمفتامین

مقدمه

افسردگی جزء شایع‌ترین اختلالات روانپزشکی با شیوع ۱۵ تا ۲۵ درصد می‌باشد (۱). این اختلال می‌تواند به‌طور بارزی موجب افت عملکرد بیمار در همه زمینه‌های شغلی و روابط اجتماعی و خانوادگی و همچنین موجب عدم احساس لذت و فشار عاطفی و روانی شدیدی برای بیمار گردد (۲). مبتلایان به این اختلال ممکن است به حدی از ناامیدی برسند که به فکر خودکشی بیافتند. تا

دو سوم مبتلایان افکار خودکشی داشته و حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد هم اقدام به خودکشی می‌کنند (۱).

پنج‌ده درصد مبتلایان در محدوده سنی ۲۰ تا ۵۰ سال قرار دارند و همچنین یافته‌های جدید همه‌گیری شناختی (اپیدمیولوژیک) حاکی از افزایش شیوع در سنین زیر ۲۰ سال می‌باشد (۱). لذا مشاهده می‌شود بخش عمده‌ای از مبتلایان را قشر فعال و مؤثر جامعه تشکیل

این تحقیق طی شماره ۴۰-۷۹ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت گردیده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام پذیرفته است.

* دانشیار گروه روانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران ☒ ساری- جاده نکا- بیمارستان زارع

** متخصص فارماکولوژی- استادیار دانشگاه علوم پزشکی مازندران

*** روانپزشک بیمارستان امام رضا (ع) آمل

می‌دهند که بیانگر تأثیرات مخرب و شایان توجه این اختلال است. درمان‌های دارویی در دسترس برای اختلال افسردگی شامل گروه داروهای چند حلقه‌ای، گروه داروهای مهارکننده اختصاصی بازجذب سروتونین (SSRI)، گروه داروهای مهارکننده آنزیم مونوآمین اکسیداز (MAOI)، و چند نمونه داروی غیرنوعی جدید مانند بوپروپیون، نفازودون و نلافاکسین و غیره می‌باشند (۲،۱).

داروها عمدتاً از طریق تغییر میزان آزاد شدن انتقال دهنده‌های عصبی (نوروترانسمیترها) و یا فعال یا غیرفعال کردن گیرنده‌ها آثار خود را اعمال می‌نمایند. عموماً داروهای در دسترس واجد عوارض جانبی ناخواسته مزاحم و بعضاً خطرناک می‌باشند. لذا جهت‌گیری به سمت معرفی داروهای مؤثر و در عین حال با عوارض جانبی کمتر، منطقی به نظر می‌رسد.

نکته دیگر، نگرش فرهنگ‌ها و خرده فرهنگ‌ها به مسایل روز علمی و به خصوص دارو می‌باشد. چنانچه به نظر می‌رسد با توجه به تولید و فروش داروهای متعدد گیاهی در جامعه ما اقبال عمومی به سمت داروهای طبیعی و به خصوص داروهای گیاهی باشد.

عصاره گل سرخ که حاوی چندین ماده مؤثر می‌باشد از دیرباز در متون طبی سنتی به عنوان نشاط‌افزا، ضد اضطراب و ضد افسردگی مطرح گردیده است (۵،۴،۳).

گل سرخ با نام علمی و گیاه‌شناختی (Botanic) رزا داماسنا (*Rosa Damascena*) شناخته شده و عصاره آن از کاسبرگ و گلبرگ (Petal) گیاه استخراج شده که حاوی ۳۰۰ نوع ترکیب متفاوت بوده که ۵۰ ترکیب آن شناخته شده است (۷،۶،۴). گیاه عمدتاً در بلغارستان، ترکیه و فرانسه به صورت صنعتی کشت می‌شود ولی در اکثر مناطق خاورمیانه، اروپا و روسیه نیز به وفور یافت می‌شود (۸،۳). گل سرخ در بسیاری از مناطق ایران نیز به خوبی می‌روید.

عصاره آن به رنگ زرد روشن با طعم کمی شیرین و عطر نافذ می‌باشد که به نام Otto of Rose شهرت دارد (۱۰،۹). مواد عمده و مؤثر آن در ترکیبی که در بازار دارویی ایران موجود است شامل ۳۰ تا ۴۰ درصد Geraniol، ۴۰ تا ۶۰ درصد Citronellol، ۲۰ تا ۳۰ درصد Linalool و ۲۰ تا ۲۵ درصد Stearopten می‌باشد. این عصاره از پوست و مخاط قابل جذب بوده و تقریباً به طور کامل از دستگاه گوارش جذب شده و مقداری نیز تجزیه شده و در کبد سوخته (متابولیزه) می‌شود. مقداری از دارو مستقیماً و مابقی پس از سوختن از طریق ادرار دفع می‌شود. مقدار کمی نیز به ویتامین‌های C و A تبدیل می‌شود (۹). قطره گل سرخ کاهنده فعالیت سیستم سمپاتیک و تقویت کننده سیستم پاراسمپاتیک می‌باشد. از خواص دیگری که برای آن ذکر گردیده است اثر ضد افسردگی، تنظیم کننده اشتها، آرامبخش، ترمیم کننده پوست، ضد خشکی و خارش پوست، ضد استفراغ، و درمان کننده سنگ صفرا و التهاب کبد، آسم و سرفه، ناتوانی جنسی و سرد مزاجی، سردرد و بیخوابی می‌باشد. روش‌های استفاده شامل روش خوراکی، استنشاقی و موضعی از راه پوست می‌باشد (۱۱،۸).

در متون علمی نوین که بیشتر مربوط به طب جایگزین (Alternative medicine) می‌شود، عمدتاً از گل سرخ برای رایحه درمانی (Aromatherapy) استفاده شده است (۱۰،۹،۸) و مطالبی که در مورد اثرات درمانی یا عوارض جانبی آن نگاشته شده است عمدتاً گزارش موارد و اظهار نظرهای غیرتحقیقاتی بوده‌اند. تحقیقات تجربی نوین تنها بر روی تعدادی از مشتقات یا اجزاء تشکیل دهنده عصاره گل سرخ انجام شده است (۱۲،۱۳،۱۴)، گرچه در متون متعددی مکرراً بر سمی، حساسیت‌زا، و کشنده نبودن عصاره گل سرخ تأکید

* قطره افشرد گل سرخ ۲٪ - باریج اسانس - مجتمع کشت و صنعت گلکاران

شده است (۱۰،۹۸). با این حال به دلیل این که مطالعه تجربی یا آزمون بالینی معتبری بر روی این ماده گیاهی، انجام نشده ممکن است واجد اثرات جانبی مهم (هرچند ناچیز) باشد.

با توجه به مراتب فوق بر آن شدیم که اثرات ضدافسردگی احتمالی گل سرخ را از طریق یک پژوهش تجربی آزمون کنیم، و در قدم اول این مطالعه را بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام دهیم.

مواد و روش‌ها

مطالعه به صورت تجربی و بی‌خبر با گروه شاهد در آزمایشگاه فارماکولوژی دانشکده پزشکی ساری طبق اجزاء زیر اجرا گردید.

۱- حیوانات

از موش‌های آزمایشگاهی خانه حیوانات دانشکده پزشکی استفاده شد. نمونه‌ها شامل موش‌های نر از نژاد Swiss-webster با وزن معادل ۲۵ تا ۳۰ گرم بودند. در طول دوره مطالعه، نمونه‌ها در خانه حیوانات با شرایط یکسان نگهداری می‌شدند. این شرایط شامل دوره تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته و منظم، درجه حرارت 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد، و فراهم بودن آب و غذا در طول شبانه روز به غیر از زمان آزمون بود. به منظور حفظ موازن علمی از هر نمونه فقط یک نوبت آزمایش به عمل می‌آمد.

۲- آزمون شنای اجباری (Forced swimming test)

این آزمون یکی از معتبرترین و رایج‌ترین الگوهای حیوانی برای بررسی افسردگی می‌باشد (۱۶،۱۵). بر اساس نظریه درماندگی آموخته شده آقای مارتین سلیگمن در صورتی که حیوان در معرض استرس مداوم قرار گیرد و راه گریزی از آن نداشته باشد، رفته رفته

امید به گریز از این شرایط را از دست داده و تحرک و فعالیت خود را متوقف می‌نماید و درمانده و بی‌حرکت می‌گردد (۲۰،۱). برای اندازه‌گیری زمان بی‌حرکتی (Immobility time) مجموعه زمان‌هایی که جانور بی‌حرکت می‌ماند را طی یک محدوده زمانی مشخص ثبت می‌نمایند. افزایش زمان بی‌حرکتی را معادل افسردگی و کاهش آن را به مثابه اثربخشی درمان ضدافسردگی در نظر می‌گیرند.

روش آزمایش به این صورت بود که ظرف شیشه‌ای به طول ۲۵ سانتی‌متر و عرض ۱۲ سانتی‌متر با ارتفاع ۸ سانتی‌متر از آب ۲۵ درجه سانتی‌گراد پر می‌شد و جانور از ارتفاع ۲۰ سانتی‌متری و به ملایمت درون آب قرار داده می‌شد. به طور قراردادی، قطع حرکات دست و پای موش به عنوان بی‌حرکت شدن در نظر گرفته می‌شد. تمام نمونه‌ها به وسیله یک فرد زمانگیری می‌شد و فرد مزبور از این که نمونه به کدام گروه تعلق داشت کوچکترین اطلاعی نداشت. زمان انجام آزمایش و شرایط محیط برای تمام گروه‌ها یکسان بود. کل آزمایش شنای اجباری ده دقیقه بود. در دو دقیقه نخست که برای تطابق حیوان با شرایط موجود در نظر گرفته شده بود زمان بی‌حرکتی ثبت نمی‌شد بلکه زمان بی‌حرکتی برای ۸ دقیقه بعدی اندازه‌گیری می‌شد.

۳- داروها

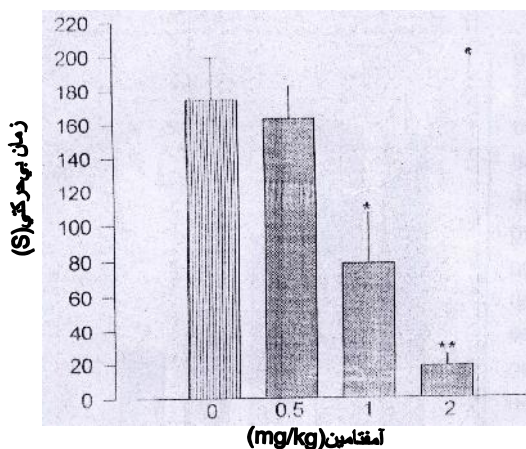
داروهای مورد استفاده به شرح ذیل بودند: آمفتامین هیدروکلراید (Sigma, USA)، و قطره گل سرخ (باریج اسانس، ایران).

داروها در سالیन حل شده و با حجم ۱۰ ml/kg به حیوانات تزریق شدند. تهیه دارو بلافاصله قبل از شروع آزمون انجام می‌شد و مانده دارو در شرایط استاندارد نور و حرارت و رطوبت طبق توصیه شرکت سازنده نگهداری می‌شد. محاسبه میزان مورد نیاز آمفتامین بر

قطره گل سرخ در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ درصد تهیه و پس از ترکیب با NaOH جهت تعدیل pH، تزریق زیر جلدی گردید. قطره گل سرخ با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ درصد به طور معنی‌داری زمان بی‌حرکتی موش را در آزمون شنای اجباری کاهش داد (گروه/ (n=7).

$$[F(4,30)=10/851, P<0/001]$$

دوز ۵ درصد در این رابطه بی‌اثر بود و حداکثر پاسخ برای قطره گل سرخ در غلظت ۴۰ درصد به دست آمد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: اثر آنیسمین بر زمان بی‌حرکتی موش در آزمون شنای اجباری.

*P<0.01
 **P<0.001

اساس مقدار پایه (Base) آن در فرآورده صورت می‌گرفت. تزریق آمفتامین به وسیله سرنگ انسولین و داخل صفاق صورت گرفته و تزریق قطره گل سرخ به صورت زیر جلدی انجام می‌گرفت. pH قطره گل سرخ برابر ۴/۵۸ بود، لذا ابتدا توسط NaOH ۰/۱ نرمال به pH ۷/۲±۲ رسانده شده و سپس تزریق انجام می‌شد. حامل شاهد برای قطره گل سرخ اتانل در سالیان (۱ درصد) و برای آمفتامین سالیان بود.

کلیه عملیات توسط یک فرد ثابت صورت می‌گرفت.

۴- تحلیل داده‌ها

پس از اخذ و ثبت اطلاعات و جمع‌بندی برای تحلیل آماری از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و متعاقب آن از آزمون Student- Newman- Keuls استفاده گردید. اختلاف بین گروه‌ها با $P<0/05$ در هر نقطه از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

الف) اثر آمفتامین بر زمان بی‌حرکتی موش در آزمون شنای اجباری

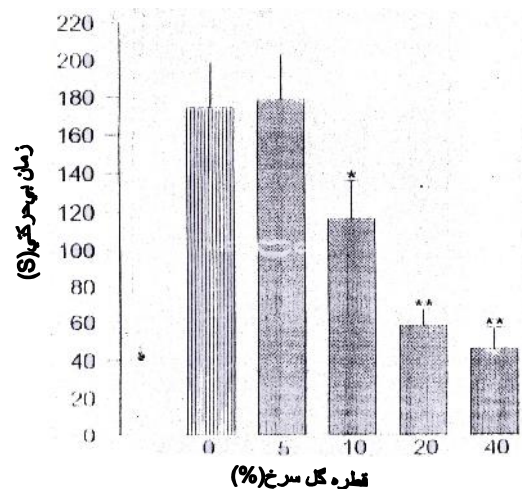
تزریق آمفتامین به صورت داخل صفاقی با دوز ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن انجام گرفت. تزریق داخل صفاقی آمفتامین با دوزهای ۱ و ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن به صورت وابسته به دوز زمان بی‌حرکتی موش را در آزمون شنای اجباری کاهش داد (گروه/ ۱) (n=).

$$[F(3,24)=18/655, P<0/001]$$

دوز ۵ mg/kg آمفتامین داخل صفاقی در این رابطه بی‌اثر بود (تصویر شماره ۱).

ب) اثر عصا گل سرخ بر زمان بی‌حرکتی موش در آزمون شنای اجباری

که موجب تغییر رهاسازی کاتکول آمین ها از نورون های پیش پیوند گاهی می شوند، مثل متیل فنیدیت و آمفتامین. این داروها معمولاً در افسردگی های مقاوم به درمان، به ویژه در سالمندان و همچنین افسردگی در بیماری های طبی شدید، به تنهایی یا به عنوان تقویت کننده اثرات داروهای گروه اول و دوم به کار می روند. در نهایت گروه چهارم شامل داروهایی است که اثرات پیچیده ای بر سازوکارهای منوآمین دارند، مثل میانسیرین و ترازودون، که نمی توان آنها را به آسانی در گروه های قبلی طبقه بندی کرد (۲، ۱۸-۲۶). سایکوفارماکولوژی مدرن، با مطالعه راه های درون نورونی، علاوه بر فراهم کردن بینش نسبت به ساز و کارهای مولکولی



تصویر شماره ۲: اثر عصاره گل سرخ بر زمان بی حرکتی موش در آزمون شنای اجباری.

*P<0.05
**P<0.001

بحث

افسردگی را نشانگان بالینی نهایی یک وضعیت ناهمگون (هتروژن) می دانند و معتقدند که داروهای ضد افسردگی، صرف نظر از تمایل ویژه به یکی از آمین های بیوژنیک، تقریباً در دو سوم مبتلایان به افسردگی به یک اندازه مؤثرند. لذا داروها بر متابولیت نوروشیمیایی دیستال زمینه بیولوژیک معیوب اثر می کنند و نه بر ضایعه اولیه مولد افسردگی (۱۷). گروه های مختلفی از داروهای ضد افسردگی که طی دهه گذشته وارد بازار شده اند، شاهد غیر مستقیمی مبنی بر ناهمگونی ضایعات زیست شیمیایی است (۱۷). این داروها را بسته به خواص حاد دارو شناختی به چند گروه تقسیم می کنند. گروه اول شامل ترکیباتی است که جذب نورآدرنالین یا سروتونین را مهار کرده، باعث افزایش عملکرد آنها در مغز می شوند. این گروه شامل داروهای ضد افسردگی سه حلقه ای و مهار کننده های اختصاصی باز جذب سروتونین است. گروه دوم شامل داروهایی است که با مهار آنزیم منوآمین اکسیداز از تخریب کاتکول آمین ها جلوگیری می کنند، مانند ایزوکربوکسازید و ترانیل سیپرومین. گروه سوم شامل سمپاتومیمتیک هایی است

پیوند گاه های عصبی به رمز گشایی نحوه عمل داروهای روان پزشکی پرداخته است (۲۷).

یافته های این مطالعه اثر ضد افسردگی قطره گل سرخ را تأیید می کند. طبق این الگوی حیوانی قطره گل سرخ به طور معنی داری موجب کاهش زمان بی حرکتی جانور در آزمون شنای اجباری گردید. نظر به این که اثر قطره گل سرخ مانند آمفتامین به صورت حاد و بافاصله کم ظاهر شده است، احتمال دارد اثر قطره گل سرخ بر زمان بی حرکتی موش در آزمون شنای اجباری یک اثر پیش پیوندگاهی (Presynaptic) و ناشی از تغییر رهاسازی آمین های پیش پیوندگاهی باشد. لذا برای تأیید این امر به نظر می رسد می توان از رزپین استفاده نمود. رزپین آلوکالوئیدی از گیاه روفلیا بوده که قادر است انتقال دهنده عصبی نورون های آمینرژیک را تخلیه نماید. نشانگانی که با رزپین و ترکیبات مربوط به آن ایجاد می شود در میان مدل های داروشناختی افسردگی بیشتر از بقیه مورد استفاده قرار می گیرد. وقتی رزپین به انواع مختلفی از حیوانات داده می شود، رفتارهای مشخصه ویژه ای ایجاد می کند (از جمله پتوز، کاهش

البته در مورد تمام آزمون‌های تجربی باید در نظر داشت که سازوکار احتمالی تاثیر دارو در حیوانات ضرورتاً همانی نیست که در مورد افسردگی انسان وجود دارد (۲۶). لذا گام بعدی در بررسی اثر ضد افسردگی قطره گل سرخ، طراحی یک آزمایش بالینی با گروه شاهد و تأیید یا رد یافته‌های فوق می‌باشد.

درجه حرارت، نافع‌الی، ترک اجتماع و بی‌حالی) که معادل افسردگی انسانی است که در مصرف کنندگان رزپین به‌عنوان داروی پُرفشاری خون ایجاد می‌شود (۲۶). به کار بردن رزپین و پس از آن تکرار مراحل فوق می‌تواند با عنوان راهی برای بررسی سازوکار اثر قطره گل سرخ مورد مطالعه قرار گیرد.

فهرست منابع

- Blazer D.G. Mood disorders. In: Sadock B.J, Sadock V.A (eds). *Kaplan & Sadock Comprehensive Textbook of Psychiatry*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 1298-1308.
- Kaplan & Sadock. *Synopsis of psychiatry*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 1988: 524-573.
۳. امین، غلامرضا. گیاهان دارویی و سنتی ایران. جلد اول، تهران: مؤسسه پژوهش‌های گیاهان دارویی ایران، خرداد ۱۳۷۰، صفحه ۷۹.
۴. موفق‌الدین ابومنصور، علی‌الطهری. *الانبيہ عن حقایق الادویه*. تهران: مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، آبان ۱۳۷۱، صفحات ۱۴۴ و ۲۱۷-۲۳۰.
۵. افشار سیستانی، ایرج. *پزشکی سنتی مردم ایران*. تهران: انتشارات روزنه، ۱۳۷۰، صفحه ۳۰۲.
۶. آزادبخت، محمد. *رده‌بندی داروهای گیاهی*. تهران: مؤسسه فرهنگی انتشاراتی تیمورزاده، بهار ۷۸، صفحه ۱۳۰.
۷. آیینی‌چی، یعقوب. *مفردات پزشکی و گیاهان دارویی ایران*. تهران: مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، اردیبهشت ۱۳۶۵، صفحه ۲۲۳.
- Lawless Julia. The illustrated encyclopedia of essential oils. Rockport
- MA: *Element books*. Richards, 1995: 56-57.
- Hammer Smith. *Aromatherapy workbook*. London: Thorsons. 1993: 54-55.
- Kevala Rogers. *Essential oil advice and information*. kevala center, June 2000: 206-217.
- Tisserond Robert. *Essential oil safety*. Uk: Churchill Livingstone, 1995: 210.
- Komori T, Fujiwara R, Tanida M. Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. *Neuroimmunomodulation*. 1995 May-Jun; 2(3): 174-80.
- Komori T, Fujiwara R, Tanida M, Momura J. Application of fragrances to treatments for depression. *Nihon-Shinkei- Seishin- Yakurigaku- Zasshi*. 1995 Feb; 15(1): 39-42.
- Komori T, Fujiwara R. Tanida M. Potential antidepressant effects of Leman odor in rats. *Eur-Neuropsychopharmacology*. 1995 Dec; 5(4): 447-80.
- Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing

- antidepressant activity? *Psychopharmacology*. Berlin 1988 ; 94(2): 147- 160.
16. Porsolt R.D, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to anti-depressant treatments. *Nature*. 1977 Apr 21; 266(5604): 730-2.
17. Akiskal H.S. Mood disorders: introduction and overview. In: Sadock B.J, Sadock V.A (eds). *Kaplan & Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 1284-1298.
18. Gelder M, Gath D, Mayou R, Cowen P. *Oxford Textbook of Psychiatry*. 3th ed. Oxford University Press. 1996: 558-578.
19. Heninger GR. Antidepressants. In: Gelder M.G, Lopez-Ibor Jr JJ, and Andreasen N.C. (eds). *New Oxford Textbook of Psychiatry*. Oxford University Press. 2000: 1293- 1305.
20. Burns MM, Eisendrath S.J. Dextroamphetamine treatment for depression in terminally ill patients. *Psychosomatics*. 1994; 35(1): 80-83.
21. Olin J, Masand P. Psychostimulants for depression in hospitalized cancer patients. *Psychosomatics*. 1996; 37(1): 57-62.
22. Wagner G.J, Rabkin J.G, Rabkin R. Dextroamphetamine as a treatment for depression and low energy in AIDS patients. *J Psychosom Res*. 1997; 42(4): 407-411.
23. Gupta S, Ghaly N, Dewan M. Augmenting fluoxetine with dextroamphetamine to treat refractory depression. *Hosp Community Psychiatry*. 1992; 43(3): 281-283.
24. Fawcett J, Kravits H.M, Zajecka J.M, Schaff M.R. CNS stimulant potentiation of monoamine oxidase inhibitors in treatment-refractory depression. *J Clin Psychopharmacol*. 1991; 11(2): 127-132.
25. Warneke L. Psychostimulants in psychiatry. *Can J Psychiatry*. 1990; 35(1): 3-10.
26. Fuller M.A, Sajatovic M. *Drug information for mental health*. American Pharmaceutical Association. Hudson (Cleveland): Lexi-comp, INC, 2001: 637.
27. McKinney W.T. Animal research and its relevance to psychiatry. In: Sadock B.J, Sadock V.A (eds). *Kaplan & Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2000: 545-562.