

Protective Effect of Sankol Herbal Product on Kidney Stone in Balb/C Mice

Fatemeh Akbari¹,
Mohammad Azadbakht²,
Ali Davoodi³,
LaleVahedi⁴

¹ Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD Student in Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 17, 2018 ; Accepted November 19, 2019)

Abstract

Background and purpose: Kidney stone is a common form of kidney disease and many efforts have been made to find medications for its prevention and treatment. Current study evaluated the protective effects of Sankol herbal product in the formation of renal stone in male Balb/c mice.

Materials and methods: Nephrolithiasis was induced in male Balb/C mice within 21 days by adding 75% ethylene glycol (EG) v/v and 2% Ammonium Chloride (AC) w/v in drinking water. Animals were divided into three groups (n=12 per group); a control group that received purified water, another group that was given EG/AC and the other group that received Sankol (Goldaro Company, Isfahan, Iran) 888mg/kg.

Results: In EG/AC group, increased levels of serum creatinine, urea, and uric acid indicated renal damage. In the group that received Sankol, these levels decreased which could help in preventing kidney stones. Histopathologic evidence showed inflammation and renal deposition in EG/AC group. In Sankol group, a decrease in the levels of renal sediments was observed, while inflammation of kidney and tissue damage increased. Present findings did not prove the safety of Sankol.

Conclusion: This study showed the beneficial effect of Sankol in preventing kidney stones but various side effects question treatment with this product.

Keywords: Sankol, Ethylene glycol, Ammonium Chloride, urolithiasis

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 29 (180): 1-7 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Azadbakht - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: azadbakhtm@hotmail.com)

اثر محافظتی فراورده گیاهی سنکل بر سنگ کلیه القا شده در مدل حیوانی

فاطمه اکبری¹
محمد آزادبخت²
علی داوودی³
لاله واحدی⁴

چکیده

سابقه و هدف: سنگ کلیه از بیماری‌های شایع می‌باشد و برای پیشگیری و درمان آن تلاش بسیاری صورت گرفته است، اما همچنان ضرورت یافتن داروهای موثرتر با عوارض جانبی کم‌تر وجود دارد. مطالعات زیادی بر روی اثر بخشی گیاهان در سنگ کلیه انجام شده است. این مطالعه نیز به اثر محافظتی فراورده گیاهی سنکل در سنگ کلیوی در مدل حیوانی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سنگ کلیه به واسطه اضافه کردن اتیلن گلیکول 0/75 درصد حجمی / حجمی و آمونیوم کلراید 1 درصد وزنی / حجمی به آب خوراکی موش‌های نر نژاد balb/c در مدت 21 روز ایجاد شد. سپس حیوانات به سه گروه 12 تایی تقسیم شدند. گروه اول (کنترل) آب مقطر، گروه دوم اتیلن گلیکول به علاوه آمونیوم کلراید و گروه سوم سنکل (شرکت گلدارو، اصفهان، ایران) با دوز 888 mg/kg دریافت کردند.

یافته‌ها: در گروه دوم، افزایش سطح سرمی کراتینین، اوره و اسید اوریک که نشان‌دهنده آسیب کلیوی است مشاهده شد. در گروه سنکل، با کاهش سطح سرمی عوامل ذکر شده، فراورده در پیشگیری از ابتلا به سنگ کلیه موثر بود. شواهد هیستوپاتولوژی، التهاب و رسوبات کلیوی را در گروه دوم نشان داد و در گروه سنکل کاهش میزان رسوبات کلیوی مشاهده شد، اما با این وجود میزان التهاب و آسیب به بافت کلیه افزایش یافته بود. بنابراین نتایج مطالعه، نتوانست ایمن بودن سنکل را تایید کند.

استنتاج: مطالعه حاضر نشان داد که سنکل اثرگذاری مطلوب در پیشگیری از سنگ کلیه دارد، اما وجود عوارض جانبی آن، استفاده از این فراورده را دچار تردید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: سنکل، اتیلن گلیکول، آمونیوم کلراید، سنگ کلیه

مقدمه

سنگ کلیه یکی از دردناک‌ترین بیماری‌های شایع و برگشت‌پذیر است. شیوع این بیماری یک نفر در هر هزار نفر در جامعه است (1). این بیماری به علت افزایش مواد محلول در ادرار یا کاهش حجم ادرار ایجاد می‌شود که این امر به فوق اشباع شدن ادرار می‌انجامد. در گذر زمان این مواد در کلیه و مجاری ادراری رسوب کرده و

مؤلف مسئول: محمد آزادبخت - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی E-mail: azadbakht@hotmai.com

1. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. دانشجوی PhD، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1397/6/17 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1397/6/18 تاریخ تصویب: 1398/8/28

حیوانات انجام گرفته است (کد اخلاق: IR.MAZUMS.REC.95.2769).

آماده سازی مدل حیوانی

برای القای سنگ کلیه در مدل حیوانی، اتیلن گلیکول و آمونیوم کلراید با خلوص 99/5 درصد و 99 درصد (شرکت مرک، آلمان) به ترتیب با نسبت 0/75 درصد حجمی / حجمی و 1 درصد وزنی / حجمی به آب خوراکی موش‌ها اضافه شد. موش‌ها به سه گروه 12 تایی تقسیم شدند. گروه اول شامل موش‌هایی که با آب مقطر تغذیه شدند و هیچ گونه ماده سنگ‌سازی در آب خوراکی آن‌ها وجود نداشت، گروه دوم اتیلن گلیکول/آمونیوم کلراید، که مواد سنگ‌ساز را در آب خوراکی دریافت کردند و گروه سوم داروی سنکل (شرکت گلدارو، اصفهان)، که علاوه بر دریافت مواد سنگ‌ساز در آب خوراکی، سنکل را با دوز 888 mg/kg به صورت گاوژ روزانه دریافت نمودند. این دوز با توجه به روابط پیچیده دوز درمانی مناسب در ابعاد موشی می‌باشد که از معادل‌سازی دوز انسانی به دست آمد (14). حیوانات آزمایشگاهی تحت 21 روز درمان با این مواد قرار گرفتند (16,15).

آنالیز سرم

بعد از اتمام دوره، موش‌ها تحت بی‌هوشی با کلروفورم قرار گرفتند و نمونه خون به صورت مستقیم از قلب آن‌ها گرفته شد و به وسیله‌ی ساترفیوژ با دور $\times 10000$ در مدت 10 دقیقه سرم خون جدا شد و برای اندازه‌گیری میزان اوره، اوریک اسید، کلسیم، فسفر و کراتینین به آزمایشگاه سرولوژی فرستاده شد (17).

هیستوپاتولوژی کلیه‌ها

بعد از جمع‌آوری خون، کلیه‌ها جدا شدند. سپس کلیه سمت چپ در ظروف نگهدارنده حاوی فرمالدهید 10 درصد قرار گرفت، برای دستیابی به بلوک‌های پاتولوژی، دستگاه microtome تکه‌های به اندازه 5 mm

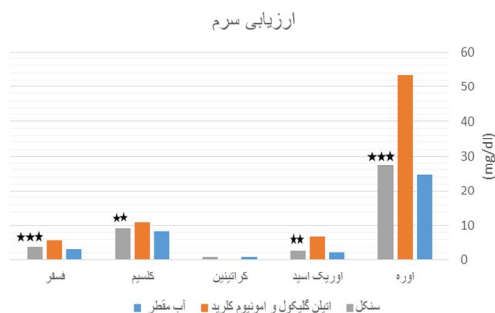
تجمع می‌یابد و بیماری به نام سنگ کلیه را ایجاد می‌کند (3,2). بنابراین عواملی نظیر سبک رژیم غذایی و مصرف بیش از حد پروتئین (4)، شرایط اقلیمی گرم و تعریق زیاد (5) هر کدام جداگانه باعث افزایش املاح ادراری یا کاهش حجم ادرار می‌شوند. سایر عوامل مانند استعداد ژنتیکی فرد (6) و چاقی (5) و باکتری‌هایی که در تشکیل سنگ نقش دارند (8,7) از عوامل موثر در ایجاد این بیماری هستند. عمده درگیری افراد به سنگ کلیه از نوع سنگ‌های کلسیم اگزالاتی می‌باشد (9). راهکار درمانی این بیماری، عمل جراحی است که در مورد سنگ‌های کوچک نا کارآمد می‌باشد، بنابراین دارو درمانی گیاهی به تنهایی یا در کنار سایر شیوه‌های درمانی می‌تواند مفید و کارآمد باشد (10). با وجود پیشرفت‌های زیاد در زمینه دارو درمانی این بیماری، هنوز ضرورت یافتن داروی موثرتر با عوارض جانبی کم‌تر وجود دارد (11). با توجه به دسترسی آسان به منابع طبیعی و یافتن درمان بسیاری از بیماری‌ها از طبیعت، تحقیقات زیادی بر روی اثربخشی گیاهان مختلف انجام گرفته است. این امر موجب تولید فرآورده‌های ترکیبی نظیر داروی سیستون (شرکت هیمالیا، هند) و داروی سنکل (شرکت گل دارو، اصفهان) برای اثر بخشی بیشتر شده است (11). با توجه به این که در فرآورده‌های ترکیبی از عصاره‌های گیاهان رازیانه، خارخاسک، برگ بو، زیره‌ی سبز و تخک خربزه استفاده شده است (12,13)، بحث سمیت در کنار کارایی اهمیت دوچندان می‌یابد. این مطالعه به بررسی عملکرد پیشگیرانه فرآورده گیاهی سنکل از تشکیل سنگ کلیه و سمیت این فرآورده می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی شرایط آزمایشگاهی

برای انجام این مطالعه موش‌های نر از نژاد balb/c با وزن بین 15 تا 20 گرم تحت شرایط استاندارد آزمایشگاهی قرار گرفتند. همچنین این مطالعه تحت نظر کمیته اخلاق

به صورت قابل توجهی افزایش را نسبت به گروه کنترل آب مقطر از خود نشان داد ($P < 0/01$)، ($P < 0/01$) و ($P < 0/001$). اما نتایج گروه سنکله حاکی از کاهش میزان حضور کریستال‌ها و رسوبات اگزالاتی و فسفات‌ها در بافت کلیوی می‌باشد (جدول شماره 1) (نمودار شماره 2).

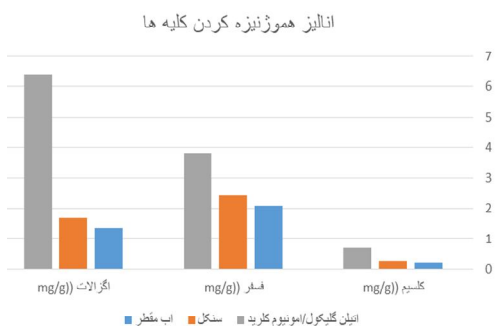


نمودار شماره 1: اثر فراورده گیاهی سنکله بر متغیرهای سرمی در سنگ کلیه ناشی از القای اتیلن گلیکول و آمونیوم کلراید. بر اساس میانگین \pm ضریب تغییرات ارزش گذاری شده است. ($P < 0/05$)*، ($P < 0/01$)** و ($P < 0/001$ ***) مقایسه براساس اختلاف با گروه کنترل و گروه اتیلن گلیکول و آمونیوم کلراید انجام گرفته است.

جدول شماره 1: سطح اگزالات و کلسیم و فسفات گروه اتیلن گلیکول/ آمونیوم کلراید a در مقایسه با گروه سنکله b و گروه کنترل آب مقطر

گروه ها	اگزالات (mg/g)	فسفر (mg/g)	کلسیم (mg/g)
آب مقطر	$0/03 \pm 1/35$	$0/8 \pm 2/14$	$0/02 \pm 0/24$
اتیلن گلیکول و آمونیوم کلراید	$***0/10 \pm 6/35$	$***0/07 \pm 3/81$	$**0/01 \pm 0/72$
سنکله	$***0/04 \pm 1/7$	$***0/05 \pm 2/41$	$**0/1 \pm 0/29$

*: $P < 0/01$ ، **: $P < 0/01$ و ***: $P < 0/001$



نمودار شماره 2: سطوح کلسیم و فسفر و اگزالات گروه سنکله در مقایسه گروه اتیلن گلیکول/ آمونیوم کلراید

از بافت ایجاد کرد و این قسمت‌ها به وسیله رنگ اتوزین و همتاکسولین رنگ آمیزی شد. بلوک‌های تهیه شده در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی 40x برای بررسی وجود رسوبات کلسیم اگزالاتی مورد ارزیابی قرار گرفتند (7).

هموژنیزه کردن کلیه‌ها

کلیه‌های سمت راست هر گروه به صورت جدا گانه در ظرف‌هایی حاوی 15 ml نیتریک اسید غلیظ قرار گرفتند، کلیه‌ها هضم و همگن شدند و با دور $3000 \times g$ به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند، قسمت رویی محلول، جدا و برای ارزیابی میزان کلسیم از دستگاه اتوآنالیزر BT3000 استفاده شد (7).

آنالیز آماری

تمامی اطلاعات به دست آمده به کمک نرم‌افزارهای SPSS و آزمون t-student مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

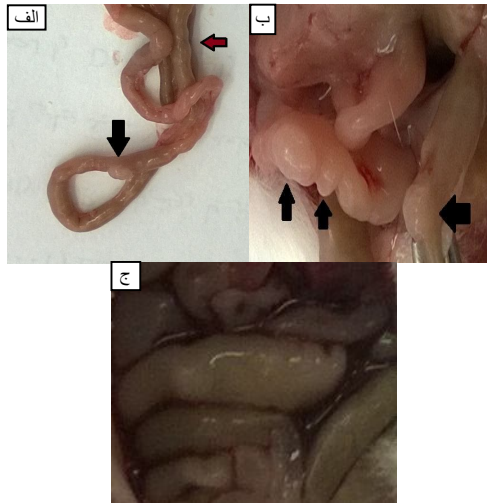
یافته‌ها

آنالیز سرم

در این مطالعه با تجویز 0/75 درصد حجمی/حجمی اتیلن گلیکول و 1 درصد وزنی/حجمی آمونیوم کلراید به موش‌های نر باعث ایجاد سنگ‌هایی در مجاری ادراری و کلیه شدیم. سطح اوره، اوریک اسید، کراتینین به صورت قابل توجهی در گروه اتیلن گلیکول/ آمونیوم کلراید به نسبت گروه آب مقطر بالا رفت و P آن به ترتیب $P < 0/05$ ، $P < 0/01$ و $P < 0/001$ به دست آمد. همچنین سطح سرمی فسفر و کلسیم در مقابل گروه آب مقطر افزایش یافته بود. با این وجود مصرف سنکله سطح سرمی اوره، اوریک اسید، کراتینین، کلسیم و فسفر را کاهش داده است (نمودار شماره 1).

آنالیز کلیه‌های هموژنیزه شده

میزان سطح اگزالات، فسفات و کلسیم کلیه‌های هموژنیزه شده در گروه اتیلن گلیکول/ آمونیوم کلراید



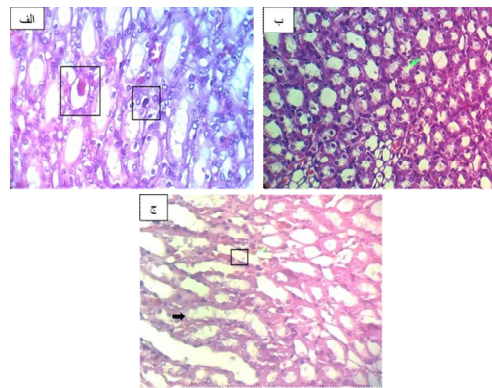
تصویر شماره 2: بررسی روده. تصویر (الف) و (ب) گروه سنکل و تصویر (ج) گروه کنترل آب مقطر را نشان می‌دهد. فلش مشکی توده‌ها و فلش‌های قرمز نشان دهنده قسمتی است که با تغییر رنگ و خاصیت ارتجاعی همراه است.

بحث

سنگ کلیه پدیده‌ای تدریجی است که با فوق اشباع شدن ادرار آغاز می‌شود و با تشکیل هسته و رشد کریستال و تجمع ذرات حل شونده‌ی ادراری پیشرفت می‌کند (18). این بیماری کلیه‌ها و مجاری ادراری را در بر می‌گیرد و مشکلاتی نظیر دفع ادرار دردناک و درد شکم ایجاد می‌کند و در موارد شدیدتر باعث نارسایی کلیه و کم‌خونی می‌شود (19). تغذیه رت‌ها با ماده اتیلن گلیکول باعث تشکیل رسوبات اگزالاتی در کلیه و ساختارهای وابسته می‌شود. آمونیوم کلراید باعث ایجاد اسیدوز متابولیک می‌شود که این ماده با ادغام با ترکیب اتیلن گلیکول برای دست‌یابی به سطوح بالایی از کریستال‌های کلسیم اگزالات استفاده می‌شود. برای این منظور اتیلن گلیکول با دوز 0/75 درصد حجمی / حجمی و آمونیوم کلراید با دوز 1 درصد وزنی / حجمی به کار می‌رود (20، 21). تشکیل سنگ باعث انسداد مجاری ادراری و کاهش جریان ادراری می‌شود و این امر موجب تجمع موادی از قبیل کراتینین، اوره و اوریک اسید در خون می‌شود (22). شواهد هیستوپاتولوژی نشان می‌دهد که در گروه اتیلن

هیستوپاتولوژی کلیه

هیستوپاتولوژی کلیه‌ها به وضوح نشان داد که در گروه کنترل آب مقطر، هیچ‌گونه تغییری در ساختار کلیه ایجاد نشده است (تصویر شماره 1.ب)، از طرف دیگر وجود رسوبات کریستالی در گروه اتیلن گلیکول/آمونیوم کلراید در بخش‌های مدولا، گلومرول، مجاری جمع‌کننده ادراری و فضای بینابینی دیده می‌شود، که نشان‌دهنده آسیب شدید به این بخش‌ها است (تصویر شماره 1.الف). درمان با سنکل باعث کاهش رسوبات ناشی از مصرف اتیلن گلیکول و آمونیوم کلراید می‌شود ولی همان‌طور که در عکس پیداست التهابات قابل توجهی در بافت کلیه گروه سنکل مشاهده می‌شود (تصویر شماره 1.ج).



تصویر شماره 1: تصویر میکروسکوپی $\times 40$ از بافت بعد از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین. تصویر (الف) تحت درمان با اتیلن گلیکول / آمونیوم کلراید، تصویر (ب) تحت درمان با آب مقطر، تصویر (ج) تحت درمان با سنکل را نشان می‌دهد. قسمت مشخص شده با مربع حضور کریستال‌ها و قسمت مشخص شده با فلش مشکی التهابات را نشان می‌دهد.

بررسی ظاهری احشا

در حین جراحی با باز کردن شکم گروه سنکل، تعداد قابل توجهی توده در روده مشاهده شد و قسمت‌هایی از روده با رنگ تیره تر خاصیت ارتجاعی خود را از دست داده بودند و باعث ظاهر غیر طبیعی در روده شده بود. این امر در گروه کنترل آب مقطر و اتیلن گلیکول / آمونیوم کلراید مشاهده نشده است (تصویر شماره 2).

تابیدی بر سمیت فراورده سنکل در روده است. در این مطالعه تغییر خاصیت ارتجاعی بخشی از روده یا کل روده کوچک و بزرگ و ایجاد توده‌های متعدد بر آن، در موش‌های تحت درمان با این فراورده مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، فراورده سنکل قابلیت پیشگیری از سنگ کلیه را دارا می‌باشد اما با توجه به سمیت ژنومی این فراورده در آزمایشات پیشین و مخاطراتی که در این مطالعه برای موش‌ها ایجاد کرد (23)، انتخاب این فراورده برای درمان باید به صورت جدی مورد بررسی قرار بگیرد و جایگزین کردن سنکل با فراورده‌ها یا روش‌هایی با مخاطره کم‌تر باید مورد مطالعه قرار بگیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان کمال تشکر را از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل حمایت مالی و آقای ابراهیم مرادی از موسسه تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه دارند.

References

1. Khan SR. Renal tubular damage/dysfunction: key to the formation of kidney stones. *Urol Res* 2006; 34(2): 86-91.
2. Barzegarnejad A, Azadbakht M, Emadian O, Ahmadi M. Effect of some fractions of the extract of *Juniperus communis* fruit on solving kidney stones in vitro. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 23(110): 146-152 (Persian).
3. López M, Hoppe B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatr Nephrol* 2010; 25(1): 49-59.
4. Abbagani S, Gundimeda SD, Varre S, Ponnala D, Mundluru HP. Kidney stone disease: Etiology and evaluation. *IJABPT* 2010; 1(1): 175-182.
5. Okada A, Yasui T, Hamamoto S, Hirose M, Kubota Y, Itoh Y, et al. Genome-Wide Analysis of Genes Related to Kidney Stone Formation and Elimination in the Calcium Oxalate Nephrolithiasis Model Mouse: Detection of Stone-Preventive Factors and Involvement of Macrophage Activity. *J Bone Miner Res* 2009; 24(5): 908-924.
6. Khan A, Khan SR, Gilani AH. Studies on the in vitro and in vivo antiurolithic activity of *Holarrhena antidysenterica*. *Urol Res* 2012; 40(6): 671-681.
7. Kumar BN, Wadud A, Jahan N, Sofi G, Bano H, Makbul SA, et al. Antilithiatic effect of *Peucedanum grande* CB Clarke in chemically induced urolithiasis in rats. *J Ethnopharmacol* 2016; 194: 1122-1129.

8. Atmani F, Slimani Y, Mimouni M, Aziz M, Hacht B, Ziyat A. Effect of aqueous extract from *Herniaria hirsuta* L. on experimentally nephrolithiasic rats. *J Ethnopharmacol* 2004; 95(1): 87-93.
9. Bayir Y, Halici Z, Keles MS, Colak S, Cakir A, Kaya Y, et al. *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* extract as a preventive agent in experimentally induced urolithiasis model. *J Ethnopharmacol* 2011; 138(2): 408-414.
10. Atmani F, Slimani Y, Mimouni M, Hacht B. Prophylaxis of calcium oxalate stones by *Herniaria hirsuta* on experimentally induced nephrolithiasis in rats. *BJU Int* 2003; 92(1): 137-140.
11. Setia AP. Experiences with cystone in urolithiasis. *Probe* 1985; 24(4): 240-242.
12. Anand R, Patnaik GK, Kulshreshtha DK, Dhawan BN. Activity of certain fractions of *Tribulus terrestris* fruits against experimentally induced urolithiasis in rats. *Indian J Exp Biol* 1994; 32(8): 548-552.
13. Svoboda KP, Deans SG. Biological activities of essential oils from selected aromatic plants. *Acta Horticulturae* 1995; 390: 203-209.
14. Hosseini A, Shorofi SA, Davoodi A, Azadbakht M. Starting dose calculation for medicinal plants in animal studies; recommendation of a simple and reliable method. *Res J Pharmacogn* 2018; 5(2): 1-7.
15. Farooq SM, Ebrahim AS, Asokan D, Sakthivel R, Savitha S, Rajesh NG. Credentials of *Spiruina* diet on stability and flux related properties on the biomineralization process during oxalate mediated renal calcification in rats. *Clin Nutr* 2005; 24(6): 932-942.
16. Selvam R, Kalaiselvi P, Govindaraj A, Murugan VB, Kumar AS. Effect of *A. lanata* leaf extract and *Vediuppu chunnam* on the urinary risk factors of calcium oxalate urolithiasis during experimental hyperoxaluria. *Pharmacol Res* 2001; 43(1): 89-93.
17. Aslam M, Ahmad ST, Dayal R, Javid K, Umar S, Asiaf A, et al. Nephroprotective action of *Peucedanum grande* against cadmium chloride induced renal toxicity in Wistar rats. *EXCLI Journal* 2012; 11(9): 444-452.
18. Gupta M, Bhayana S, Sikka S. Role of urinary inhibitors and promoters in calcium oxalate crystallisation. *IJRPC* 2011; 1(4): 793-798.
19. Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison's nephrology and acid-base disorders, 3e* (Harrison's Specialty) 3rd ed. McGraw-Hill Education/Medical; 2016.
20. Fan J, Glass MA, Chandhoke PS. Impact of ammonium chloride administration on a rat ethylene glycol urolithiasis model. *Scanning Microsc* 1999; 13(2-3): 299-306.
21. Bobbitt WH, Williams RM, Freed CR. Severe ethylene glycol intoxication with multisystem failure. *West J Med* 1986; 144(2): 225-228.
22. Thangarathinam N, Jayshree N, Metha AV, Ramanathan L. Effect of polyherbal formulation on ethylene glycol induced urolithiasis. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013; 5(3): 994-997.
23. Saadat M, Saadat I. Effect of two herbal products, *Prostatan* and *Sankol*, on human chromosomes. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research* 2002; 10(40): 9-15.