



**NWSA-PHYSICAL SCIENCES**

Received: September 2012

Accepted: January 2013

NWSA ID : 2013.8.1.3A0064

ISSN : 1308-7304

© 2013 www.newwsa.com

**Mustafa Karatepe**

Fırat University, Elazığ-Turkey

mkaratepe@firat.edu.tr

**TİYOSEMİKARBAZON VE METAL KOMPLEKSLERİNİN RATLARDA  
SERUM AMİNO ASİT DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

**ÖZET**

Tiyosemikarbazon (TSC) ve Schiff bazlarının (SB) çeşitli türevleri ve bunların metal kompleksleri antitümör, antineoplastik, antiviral, antibakteriyel, antimalarial gibi biyolojik fonksiyonlarından dolayı kimya, biyoloji ve farmakoloji bilim dallarında büyük ilgi görmektedir. Ayrıca bu bileşiklerin yapı aktivite ilişkisi (QSAR) araştırmaları birçok çalışmaya konu olmaktadır. Bu çalışmada, tiyosemikarbazon türevi bileşiklerin ve metal komplekslerinin serum amino asit düzeylerine etkisi incelendi. Yapılan çalışmalar sonucunda, bileşiklerin, serum amino asit düzeylerini azalttığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Tiyosemikarbazon, Metal Kompleksi, Serum, Amino Asit, Rat

**SERUM AMINO ACID LEVELS WITH THIOSEMICARBAZONE DERIVATIVES  
AND ITS METAL COMPLEXES TREATED RATS**

**ABSTRACT**

Thiosemicarbazone (TSC) and Schiff base (SB) derivatives have raised considerable interest in chemistry, biology and pharmacology due to their antitumor, antibacterial, antimalarial, antineoplastic and antiviral activities. In addition, many studies have focused on qualitative structure activity relationship (QSAR) of the compounds. In this study, effects of the serum free amino acid level of the thiosemicarbazone and its metal complexes on rats. Our findings indicate that all compounds were decreased serum amino acid levels.

**Keywords:** Thiosemicarbazone, Metal Complex, Serum, Amino Acid, Rat

## 1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Tiyosemikarbazon (TSC) türevleri antiviral, antineoplastik, antimalarial, antifungal ve antibakteriyal özelliklerinden dolayı farmakolojide büyük ilgi görmektedir [1]. Bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin, molekülün iki azot atomu ve bir kükürt atomu ile esansiyel ağır metal iyonları arasında oluşan üç dişli şelat oluşturma yeteneğinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir [2]. Bazı araştırmacılar ligandlara göre şelatların daha aktif olduğunu ve aromatik aldehitlerle süstitüe olmuş TSC'ler ve metal komplekslerinin güçlü bir farmakolojik etkiye sahip olduklarını rapor etmektedirler [3]. TSC-bakır komplekslerinin indirgenme potansiyellerinin, kalp mitokondrial oksidatif fosforilasyonunu inhibe edici ve tümör hücrelerine karşı *in vitro* sitotoksik etkileri ile doğrudan ilişkili olduğu belirtilmektedir [4]. Çeşitli TSC türevleri ve bakır komplekslerinin spektrofotometrik davranışlarının süperoksit dismutaz (SOD) ile mukayesesi yapılan bir çalışmada, bu bileşiklerin geniş spektrumlu biyolojik aktivitelerinin yanısıra SOD benzeri aktivite gösterdikleri de vurgulanmaktadır [5].

Tiyosemikarbazonlar ve Schiff bazları DNA ve RNA sentezini inhibe etmektedirler. Onların bu etkisi ribonükleotitleri deoksiribonükleotitlere indirgeyen ribonükleotit difosfat redüktazın bilinen en güçlü inhibitörü olmalarından kaynaklanmaktadır [2]. Ayrıca N-Metil isatin  $\beta$ -tiyosemikarbazon 1-formilzokinolin bakır komplekslerinin amino açıl tRNA sentetaz aktivitesini inhibe ettikleri ve bu inhibisyonda 1:1 ligand metal kompleksinin 2:1 kompleksinden daha aktif olduğu rapor edilmektedir [6].

Yaptığımız bir çalışmada, tiyosemikarbazon türevi ihtiva eden Schiff bazı türevi ve Cd(II) metal kompleksi ratlara yüksek dozlarda derialtı olarak enjekte edildiğinde, oksidatif stres oluşturarak, serumda antioksidan vitaminlerden A ve E'nin düzeylerinde azalma, serum MDA düzeyinde ise yükselme meydana getirdiği, testis dokusunda ise hasar oluşturduğu görüldü [7]. Yine başka bir çalışmada, bu Schiff bazı türevi ile Zn(II) ve Cu(II) metal kompleksleri deri altı uygulandığında, ligandın antioksidan parametreleri etkilemediği, Cu(II) kompleksinin Cd(II) kompleksinde olduğu gibi serum vitamin düzeylerini azaltıp, MDA düzeyini ve eritrosit GSH-Px enzim aktivitesini artırdığını, Zn(II) kompleksinin ise her hangi bir oksidatif stres oluşturmadığı ve serum E vitamini düzeyinde ise bu vitaminin kullanımını azaltarak artışa neden olup bir antioksidan gibi davrandığı, fakat tüm bileşiklerin serumda metiyonin ve izolösin gibi bazı esansiyel amino asitlerin düzeylerini artırdığı ve karaciğer, böbrek ve adren dokularında her hangi bir hasar oluşturmadığı gözlemlendi [8].

Tiyosemikarbazon ve asethidrazon türevlerinin farelere intraperitoneal olarak uygulanması ile bu bileşiklerin hipolipidemik etki göstererek serum kolesterol ve trigliserit seviyesinde azalma meydana getirdikleri belirtilmektedir [9]. Kumamoto ve ark., fareler ile yaptıkları çalışmada, tiyosemikarbazon türevlerinin antitiroid aktivite gösterdiğini ispatlamışlardır [10].

Bu literatür bilgilerine göre, ligandın yapısı ve konformasyonu ile koordinasyon bileşiklerindeki merkez atomunun redoks potansiyellerinin bu tür bileşiklerin biyolojik aktivitelerini etkilediği görülmektedir. Bu gibi çalışmalar daha aktif komplekslerin sentezini veya doğal biyokoordinatif bileşiklerin davranışını anlamaya yardımcı olacaktır [5].

Ayrıca bu sınıf bileşiklerin ve metal komplekslerinin oksidatif peptitlerin oluşumunda rol aldıkları ileri sürülmektedir [11].

Bu çalışmada, tiyosemikarbazon türevi bir bileşik olan 4-formilbenzidilen (hidrazinkarbotiyoamit) ve komplekslerinin ratlarda serum amino asit düzeylerini nasıl etkilediği incelenmiştir.

## 2. ÇALIŞMANIN ÖNEMİ (RESEARCH SIGNIFICANCE)

TSC ve Schiff bazlarının çeşitli türevleri ve bunların metal kompleksleri antineoplastik, antiviral, antimikrobiyal, antimalarial gibi biyolojik fonksiyonlarından dolayı kimya, biyoloji ve farmakoloji bilim dallarında büyük ilgi görmektedir. Bu bileşiklerin sahip oldukları biyolojik etkilerin değişimi sentezlenen bileşiğin yapısına, farklı süstitüentlerin konumuna ve komplekslerinde kullanılan metal atomunun özelliğine göre farklılaşmaktadır. Ayrıca ligandın konformasyonunun ve yapısının, koordinasyon bileşiklerindeki merkez atomunun redoks potansiyelini etkilediği de bildirilmektedir.

Bu çalışma oldukça önemli biyolojik aktivitelere sahip olan tiyosemikarbazon türevi bileşiklerin daha önce incelenmemiş olan serum amino asit düzeyini nasıl etkilediği konusundaki boşluğu dolduracak ve literatür bilgisine katkı sağlayacaktır.

## 3. DENEYSSEL YÖNTEM (EXPERIMENTAL METHOD)

Araştırmada 12-14 haftalık ortalama 190-220 g ağırlığında erişkin Wistar cinsi erkek ratlar kullanıldı.

Araştırmada kullanılacak ratlar 1. kontrol (yalnızca DMSO+yağ) ve diğer uygulama gruplarından oluşturuldu ve her grupta 5'er denek yer aldı.

İlgili literatür taramasından sonra [12 ve 13] ligand ve komplekslerinin molekül yapıları (büyüklük) göz önüne alınarak deri altı uygulamaların kontrol ve denek grupları için 0. gün, 3. gün, 7. gün, 10. gün olacak şekilde 3 gün ara ile yapılmasına karar verildi ve 15 gün uygulandı.

Uygulama maddelerinin dozları literatürden faydalanılarak kararlaştırıldı ve şartlara uygun olarak 25 mg/kg vücut ağırlığı [13 ve 14] olacak şekilde ayarlandı.

Uygulama sürelerinin sonunda hayvanlar eter ile anesteziye alınarak göğüs kafesleri açıldı ve kalplerinden yeterli miktarda (4-8 mL) kan alındı. Alınan kan örnekleri saftrifüjlenerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar en geç üç gün içerisinde analiz edildi. Analiz anına kadar serum örnekleri -20 °C'de bekletildi.

Amino asitlerin analizlerinde Thermo Focus GC sistemi (Thermo, Rodano Milan, Italy)EZ-Faast analiz kitleri kullanıldı. Solid faz ekstraksiyonu (SPE) ile türevlendirme reaktifleri kullanılarak hazırlanan numuneler GC ile analiz edildi [15].

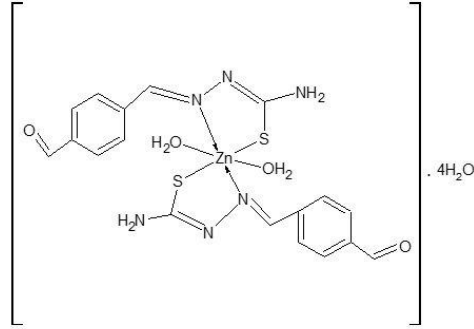
### • Ligantın (LH) FT-IR ve <sup>1</sup>H-NMR Spektal Karakterizasyonu:

LH: Beyaz renkli, katı. Verim: 67%; en: 256-257 °C; IR 3228-3150 (N-H), 1702 (C=O), 3078-3025 Ar(C-H), 1670 (C=N), 1601 (C=C), 850 (C=S) cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR δ: 10.61 (N-H), 9.70 (Aldehit proton), 8.5 (N=CH), 8.1-7.9 (Ar-H), 4.5 (NH<sub>2</sub>).

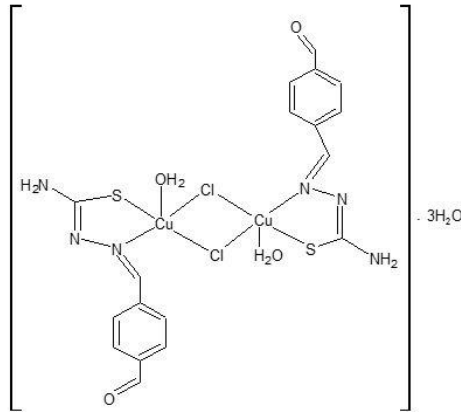
LH ligandı ve komplekslerinin yapısı aşağıdaki gibidir.



(a)



(b)



Şekil 1. (a) Pridin-2-karbaldehit ligandı (LH) ve (b) komplekslerinin yapısı

(Figure 1. (a) Structure of pyridine-2-carbaldehyde (LH) (b) suggested structure of the complexes of the ligand.)

- **İstatistiksel Değerlendirme:** Bu çalışmadaki bütün istatistiksel analizler, SPSS istatistik programı ile yapıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar LSD testi (SPSS 10.0 for Windows; Chicago, IL, USA). Kullanılarak yapıldı ( p<0.05).

#### 4. BULGULAR (FINDINGS)

Gruplara ait ortalama serum amino asit düzeylerini tüm bileşiklerin etkilediği görülmektedir.

Tablo 1. LH ligandı ve metal kompleksleri ile muamele edilmiş ratların serum amino asit düzeyleri.

(Table 1. Serum amino acid concentrations from control and thiosemicarbazone derivatives and its metal complexes-treated rats)

Groups (n=5)	Ala $\mu\text{M}$	Gly $\mu\text{M}$	Val $\mu\text{M}$	Leu $\mu\text{M}$	İle $\mu\text{M}$	Pro $\mu\text{M}$
K	547,6 $\pm$ 44,4	311,5 $\pm$ 25,6	221,4 $\pm$ 11,6	213,4 $\pm$ 9,7	128,7 $\pm$ 4,3	4941,2 $\pm$ 215,4
LH	329,6 $\pm$ 21,4 <sup>c</sup>	171,6 $\pm$ 13,6 <sup>c</sup>	169,4 $\pm$ 35,5 <sup>b</sup>	118,4 $\pm$ 21,5 <sup>c</sup>	74,8 $\pm$ 11,5 <sup>c</sup>	170,4 $\pm$ 41,9 <sup>c</sup>
LH-Zn	329,6 $\pm$ 21,1 <sup>c</sup>	171,3 $\pm$ 12,0 <sup>c</sup>	170,4 $\pm$ 36,6 <sup>b</sup>	120,1 $\pm$ 21,3 <sup>c</sup>	75,2 $\pm$ 12,1 <sup>c</sup>	171,9 $\pm$ 43,2 <sup>c</sup>
LH-Cu	317,9 $\pm$ 21,1 <sup>c</sup>	188,1 $\pm$ 18,1 <sup>c</sup>	158,2 $\pm$ 25,3 <sup>b</sup>	106,9 $\pm$ 11,9 <sup>c</sup>	65,1 $\pm$ 7,4 <sup>c</sup>	156,3 $\pm$ 12,6 <sup>c</sup>

Groups (n=5)	Asn $\mu\text{M}$	Asp $\mu\text{M}$	Met $\mu\text{M}$	Hyp $\mu\text{M}$	Glu $\mu\text{M}$	Phe $\mu\text{M}$
K	729,3 $\pm$ 89,1	53,4 $\pm$ 9,8	73,5 $\pm$ 9,8	21,3 $\pm$ 2,5	257,7 $\pm$ 57,2	81,2 $\pm$ 3,9
LH	82,8 $\pm$ 13,6 <sup>c</sup>	57,3 $\pm$ 9,4	41,2 $\pm$ 7,4 <sup>c</sup>	24,3 $\pm$ 2,3	91,3 $\pm$ 7,5 <sup>c</sup>	40,4 $\pm$ 5,1 <sup>c</sup>
LH-Zn	85,0 $\pm$ 11,4 <sup>c</sup>	35,9 $\pm$ 12,3 <sup>a</sup>	39,6 $\pm$ 5,7 <sup>c</sup>	23,2 $\pm$ 5,7	87,9 $\pm$ 7,8 <sup>c</sup>	40,5 $\pm$ 4,9 <sup>c</sup>
LH-Cu	80,3 $\pm$ 9,6 <sup>c</sup>	47,9 $\pm$ 14,6	43,6 $\pm$ 3,8 <sup>c</sup>	23,2 $\pm$ 1,5	82,3 $\pm$ 12,3 <sup>c</sup>	37,7 $\pm$ 2,6 <sup>c</sup>

Groups (n=5)	Gln $\mu\text{M}$	Ort $\mu\text{M}$	Lys $\mu\text{M}$	His $\mu\text{M}$	Try $\mu\text{M}$	Trp $\mu\text{M}$
K	457,2 $\pm$ 72,3	157,1 $\pm$ 52,3	432,3 $\pm$ 29,8	63,8 $\pm$ 6,0	80,0 $\pm$ 4,5	125,9 $\pm$ 12,6
LH	387,9 $\pm$ 66,9	27,2 $\pm$ 8,5 <sup>c</sup>	159,6 $\pm$ 23,6 <sup>c</sup>	9,6 $\pm$ 2,5 <sup>c</sup>	37,5 $\pm$ 4,4 <sup>c</sup>	90,8 $\pm$ 4,9 <sup>c</sup>
LH-Zn	201,2 $\pm$ 91,4 <sup>c</sup>	20,0 $\pm$ 11,3 <sup>c</sup>	127,3 $\pm$ 19,6 <sup>c</sup>	15,3 $\pm$ 3,6 <sup>c</sup>	32,3 $\pm$ 4,0 <sup>c</sup>	72,8 $\pm$ 5,3 <sup>c</sup>
LH-Cu	521,1 $\pm$ 35,0	39,2 $\pm$ 3,9 <sup>c</sup>	163,2 $\pm$ 18,9 <sup>c</sup>	13,9 $\pm$ 2,1 <sup>c</sup>	34,4 $\pm$ 4,2 <sup>c</sup>	89,5 $\pm$ 10,6 <sup>c</sup>

a: P < 0,05; b: P < 0,01; c: P < 0,001

## 5. SONUÇLAR (CONCLUSION)

Tiyosemikarbazon (TSC) ve Schiff bazı (SB) türevleri antiviral, antineoplastik, antimalariyal, antifungal ve antibakteriyal özelliklerinden dolayı farmakolojide büyük ilgi görmektedir [1].

Bu araştırmada, tiyosemikarbazon türevi bileşik ve metal komplekslerinin ratların serum amino asitleri üzerine etkisi çalışıldı.

Tiyosemikarbazonlar, ribonükleotit difosfat redüktazın en güçlü inhibitörleri olarak bildirilmektedir [16]. Ribonükleotitleri deoksiribonükleotitlere indirgeyerek dönüşümünü sağlayan bu enzim DNA biyosentezinde hız kontrolü yapan basamak olarak görülmektedir [17]. Ribonükleotit redüktaz ADP, GDP, CDP, UDP gibi nükleotit difosfatların indirgenmesini sağlayan özel bir enzimdir [18].

Bazı tiyosemikarbazon türevlerinin hücre gelişimini, hücrel mRNA veya protein sentezine etki etmeksizin, DNA sentezlerini inhibe ederek etkilediği gösterilmiştir [19].

Başka bir araştırmada N-metil isatin beta-tiyosemikarbazon-Cu komplekslerinin nükleik asitler ve proteinlere bağlanımı UV ve görünür bölge spektroskopisiyle gösterilmiş ve bakır komplekslerinin diğer metal komplekslerine göre çok aktif olduğu belirtilmiştir [20].

Sato ve diğ. (1995) ratları %2'lik mısırozü yağı ihtiva eden ıspanak yaprağı proteinleri ile beslediklerinde, serum treonin, serin, glutamin, glisin, sistein ve izolösin düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığını, diğer amino asitlerin düzeylerinin değişmediğini gözlemişlerdir [21].

Bu çalışmada, Tablo 1'e bakıldığında amino asit düzeylerinin tüm gruplarda önemli derecede etkilenmiş olduğu ve serum düzeylerinde istatistiksel açıdan önemli azalmalar meydana geldiği görülmektedir. Bu sonuçlar maddelerin amino asit metabolizması ve protein sentezi üzerine çok etkili olabileceğini düşündürülebilir. Ancak bu sonuçları yorumlamak ve yeterince açıklamak kolay değildir.

Tiyosemikarbazon türevlerinin araştırılan birçok farmakolojik özelliklerine ilave olarak araştırılan bu parametrelerin literatür bilgisine katkıda bulunacaktır.

#### **TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGMENT)**

Bu çalışma TUBITAK 104T363 nolu proje ile desteklenmiştir.

#### **KAYNAKLAR (REFERENCES)**

1. Liberta, A.E. and West, D.X., (1992). Antifungal and Antitumour Activity of Heterocyclic Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes, *Biometals*, 5, 121-126.
2. Demertzi, D.K., Domopoulou, A., Demertzis, M.A., Valle, G., and Papageorgiou, A., (1997). Palladium (II) Complexes of 2-Acetylpyridine N(4)-Methyl, N(4)-Ethyl and N(4)-Phenyl - Thiosemicarbazones. Crystal Structure of Chloro (2-Acetylpyridine N(4)-Methylthiosemicarbazono) Palladium (II). *Synthesis, Spectral Studies, In Vitro and In Vivo Antitumour Activity*, *J. of Inorg. Biochem.*, 68, 147-155.
3. Offing, O.E. and Martelli, S., (1994). Antibacterial Activity of Metal Complexes of Benzyl and Benzoin Thiosemicarbazones, *IL Farmaco*, 49 (7,8), 513-518.
4. Chan-Stier, C.H., Minkel, D., and Petering, D.H., (1976). Reactions of bis (Thiosemicarbazono) Copper (II) Complexes with Tumor Cells and Mitochondria, *Bioinorganic Chem.*, 6 (3), 203-217.
5. Durackova, Z., Mendiola, M.A., Sevilla, M.T., and Valent, A., (1999). Thiohydrazone Copper (II) Complexes. The Relationship Between Redox Properties and Superoxide Dismutase Mimetic Activity, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 48, 109-116.
6. Rohde, W., Cordell, B., Webster, R., and Levinson, W., (1977). Inhibition of Amino Acyl tRNA Synthetase Activity by Copper Complexes of Two Metalbinding Ligands, *Biochemica et Biophys. Acta*, 477, 102-111.
7. Öner, H., Karatepe, M., Karatas, F., Öner, J., Yilmaz, I., and Cukurovalı, A. (2004) Effects on the rat testes of thiosemicarbazone derivative schiff base (4-(1-Phenyl-Methylcyclobutane-3-yl)-2-(2-Hydroxybenzylidenehydrazino) Thiazole) and its cadmium (II) complex. *Cell Biochem. And Function*, 22, 1-7.
8. Karatepe, M. and Karatas, F., (2006). Antioxidant, Pro-Oxidant Effect of the Thiosemicarbazone Derivative Schiff Base (4-(1-Phenylmethylcyclobutane-3-Yl)-2-(2 Hydroxybenzylidenehydrazino) Thiazole) and its Metal Complexes on Rats." *Cell Biochem. And Function*, 24(6), 547-554.
9. Chapman, J.M., Delucy, P., Wong, O.T., and Hall, I.H., (1990). Structure Activity Relationship of Imido N-Alkyl Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Acetylhydrazones as Hypolipidemic Agents in Rodents, *Lipids*, 25 (7), 391-397.
10. Kumamoto, T., Toyooka, K., Nishida, M., Kuwahara, H., Yoshimura, Y., Kawada, J., and Kubota, S., (1990) Effect of 2,4-Dihydro-3H-1,2,4-Triazole-3-Thiones and Thiosemicarbazones on Iodide Uptake by the Mouse Thyroid: The Relationship Between Their Structure and Anti- Thyroid Activity. *Chem. Pharm. Bull.*, 38(9): 2596-2596.
11. Strehler, B.L., Schmid, P., Li, M.P., Martin, K., and Fliss, H., (1982). Oxidative Peptide (and Amide) Formation from Schiff Base Complexes. *J. Mol. Evol.*, 19(1): 1-8.
12. Chapman, J.M., Delucy, P., Wong, O.T., and Hall, I.H., (1990). Structure Activity Relationship of Imido N-Alkyl Semicarbazones,



- Thiosemicarbazones and Acetylhydrazones as Hypolipidemic Agents in Rodents, *Lipids*, 25 (7), 391-397.
13. Papageorgiou, Z., Iakovidou, D.M., Mioglou, E., Boutis, L., Kotsis, A., Demertzi, D.K., Domopoulou, A., West, D.X., and Demertzis, M.A., (1997). Antineoplastic and Cytogenetic Effects of Complexes of Pd (II) with 4N-Substituted Derivatives of 2-Acetyl-Pyridine-Thiosemicarbazone, *Anticancer Research*, 17, 247-252.
  14. Liu, C.M., Lin, T.S., and Sartorelli, A.C., (1992). Synthesis and Antitumor Activity of Amino Derivatives of Pyridine-2-Carboxaldehyde Thiosemicarbazone, *J. Med. Chem.*, 35, 3672-3677.
  15. Mitja, K., Irma, V.K., and Mirko, P., (2007). Determination of derivatized amino acids in human embryo culture media by gas chromatography. *Journal of Chromatography B.*; 858: 292-295.
  16. Liberta, A.E. and West, D.X., (1992). Antifungal and Antitumor Activity of Heterocyclic Thiosemicarbazones and Their Metal Complexes, *Biometals*, 5, 121-126.
  17. Liu CM, Lin TS, and Sartorelli AC. (1992). Synthesis and antitumor activity of amino derivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. *J. Med. Chem.*; 35: 3672-3677.
  18. Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., and Rodwell, V.W., (1993). *Harper'in Biyokimyası* (Çev. Ed. Menteş, G., Ersöz, B), Barış Kitapevi, İstanbul.
  19. Teitz, Y., Barko, N., Abramoff, M., and Ronen, D., (1994). Relationship Between Structure and Antiretroviral Activity of Thiosemicarbazone Derivatives, *Chemotherapy*, 40, 195-200.
  20. Rohde, W., Shafer, R., Idriss, T., Levinson, W., (1979). Binding of N-Methyl Isatin Beta - Thiosemicarbazone - Copper Complexes to Proteins and Nucleic Acids, *J. Inorganic Biochem.*, 10 (3), 183-94.
  21. Satoh, A., Histomi, M., and Igarashi, K., (1995). Effects of Spinach Leaf Protein Concentrate on The Cholesterol and Amino Acid Concentrations in Rats Fed a Cholesterol - Free Diet, *J. of Nutritional Sci. and Vit.*, 41 (5), 563-573.