

산소-포도당 결핍(OGD) 유도성 신경세포 사멸에 대한 뇌 보호 효과를 가지는 수종 생약추출물의 검색

이학주* · 구 역** · 이현정* · 이동호***† · 마웅천**†

*국립산림과학원, **서울대학교 약학대학 천연물과학연구소, ***고려대학교 생명과학대학

Neuroprotective Effects of Some Plant Extracts against Oxygen-Glucose Deprivation (OGD)-Induced Oxidative Cell Death on Neuronal Cell

Hak Ju Lee*, Uk Koo**, Hyun Jung Lee*, Dongho Lee***†, and Woongchon Mar**†

*Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea.

**Natural Product Research Institute, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.

***College of Life sciences & Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea.

ABSTRACT : Cerebral ischemia results from a transient or permanent reduction in cerebral blood flow that decreases oxygen and glucose supply. When the cellular oxygen supply is reduced to critical level, damage to cells and induction of cell death are occurred by excitotoxicity, oxidative stress and inflammation. Ischemia remains one of the leading causes of death, but there is no effective treatment that might protect neurons against ischemia by interrupting the cascade of cell death. In this study, human neuroblastoma SH-SY5Y cells are exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD) followed by reoxygenation. OGD can mimic the acute restriction of metabolite and oxygen supply caused by ischemia and is widely used as a model of ischemic conditions. SH-SY5Y cells are treated samples at the commencement of OGD to achieve different final concentrations, and cell viabilities were quantified using the measurement of flow cytometry analysis. Of those tested, the extracts of *Polygala tenuifolia* (roots), *Dictamnus dasycarpus* (barks), *Polygala tenuifolia* (roots), *Eucommia ulmoides* (branches), *Eucommia ulmoides* (barks), *Poria cocos* (whole), *Sophora flavescens* (roots) showed neuroprotective effects, with EC₅₀ values of 4.5 ± 0.6, 7.9 ± 1.5, 10.5 ± 0.7, 18.4 ± 1.9, 19.6 ± 0.3, 21.6 ± 1.9 and 30.7 ± 3.9 μg/ml, respectively.

Key Words : Cerebral Ischemia, Oxygen-Glucose Deprivation (OGD), Neuroprotective Effects, FACs Analysis, EC₅₀

서 언

뇌경색의 한 종류인 뇌 허혈은 뇌혈관이 협착 되거나 혈전이 막히게 되면 혈액 공급이 차단되어, 산소와 영양분의 결핍이 일어남으로써 일어나게 된다. 인간의 장기 중, 뇌는 혈액 공급에만 전적으로 의존하여 에너지를 제공받는 기관으로 원활한 혈액 공급이 이루어지지 못했을 경우 즉각적인 손상을 받게 된다. 일반적으로 뇌 허혈의 70~80%는 혈전의 막힘으로 인한 혈액공급의 일시적 중단과 순간적인 혈전 제거에 따른 급격한 혈액 재공급으로 인하여 뇌 기능의 부분적, 전체적 손상을 일으킨다고 보고되어 있다 (Tabakman *et al.*, 2005). 이러한 직접적인 뇌세포 손상으로 인하여 세포 사멸이 유도되며, 뇌 손상 부위와 정도에 따라 행동장애, 운동장애, 인지장애

등도 발생한다. 즉, 이러한 혈액 공급 차단은 허혈성 뇌경색뿐만 아니라 전반적인 뇌 조직 손상에 따른 각종 장애를 유발 할 수 있다.

산소-포도당 결핍 (oxygen-glucose deprivation, OGD)을 통한 세포 사멸 유도 모델은 혈액의 공급 중단에 따른 허혈 상태와 유사한 환경을 설정해 주어, 허혈 상태에 따른 뇌 신경 세포 사멸을 유도하는 것이다 (Goldberg and Choi, 1993; Strasser and Fischer, 1995). 본 실험실에서는 인간 신경아세포종 SH-SY5Y 세포에 인위적으로 포도당과 혈청의 공급을 중단하고 산소가 결핍된 환경을 만들어, 세포 사멸을 유도하였다. OGD유도에 의한 세포 사멸은 일시적으로 영양분과 산소의 공급을 차단함으로써 세포에 산화적 스트레스가 유발되고 다시 영양분과 산소를 재공급함으로써 세포의 사멸을 유도

†Corresponding author: Woongchon Mar: (Phone) +82-2-880-2473 (E-mail) mars@snu.ac.kr,

Dongho Lee: (Phone) +82-2-3290-3017 (E-mail) dongholee@korea.ac.kr

Received 2009 July 31 / 1st Revised 2009 August 31 / 2nd Revised 2009 September 29 / Accepted 2009 October 13

하는 방법으로, 실제 임상학적 뇌 허혈 발생을 반영한 환경이라 할 수 있다.

① 이러한 배경 하에 OGD로 인한 신경세포 사멸에 보호 효과를 가지는 우수한 천연 자원을 탐색하여 보고자 neuronal cell death의 모델로 널리 사용되는 human SH-SY5Y neuroblastoma cell을 이용하였으며 OGD 상태를 유도하여 cell death를 일으켰다. 그리고 20시간 동안 OGD처리 시에 다양한 생약 추출물들을 대상 시료로 하여 동시에 처리 하고, 24시간 동안 산소와 영양분을 다시 공급하는 재산소화 (reoxygenation) 과정을 통해 각 시료들의 OGD 스트레스에 대한 neuroprotective effects를 FACs (flow cytometry) analysis로 확인하였다. 또한 부위별로 성분 차이가 많이 나는 생약 추출물들은 부위별로 추출하여 각 부위별 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

생약의 추출 및 시료 조제 - 실험에 사용된 생약시료들은 한국식물추출물은행에서 MeOH 추출물로 구입하여 한국 식물추출물 은행의 정확한 감정을 거친 후 실험에 사용하였으며 voucher specimen은 자생 식물 사업단에 보관되어 있다.

1. 세포배양

Hhuman SH-SY5Y neuroblastoma cell (ATCC, Rockville, MD, USA)은 10% fetal bovine serum (Gibco BRL Life Technologies, Inc., Rockville, USA) 및 antibiotics (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA)가 함유된 Dulbecco's modified eagle's medium (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA) 배지에서 배양하였다. Incubator는 37°C 온도를 유지했고 5% CO₂가 계속 공급되어 세포 배양의 적절한 조건을 갖추었다. 세포는 6-well plate에 15 × 10⁴ cells/well로 배양하였다.

2. 시료의 처리

시료는 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 μg/ml의 농도 별로 plating 24시간 후에 포도당이 없는 DMEM 배지로 교체한 후에 처리하였으며 각 추출물 시료들의 효과는 EC₅₀ (The term half maximal effective concentration)값을 지표로 하여 비교 관찰하였다. 그리고 양성 대조군은 뇌 허혈에 이미 효과가 입증된 carnosine (Min *et al.*, 2008; Rajanikant *et al.*, 2007)으로 선정하여 각 시료들의 EC₅₀ 값과 비교하여 neuroprotective effects를 비교하였다. 시료 및 carnosine은 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA)에 녹여 DMSO의 최종 농도가 0.5%가 되게 하였다.

3. SH-SY5Y Cell의 OGD-reoxygenation 유도 및 시료 처리

6-well plate에 15 × 10⁴ cells/well로 배양한 뒤 24시간 후

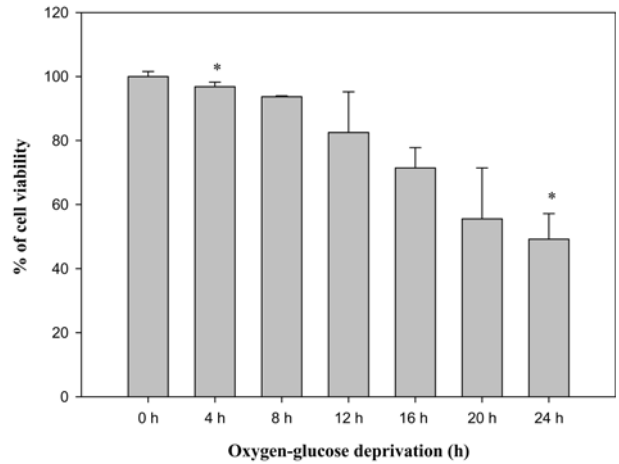


Fig. 1. Time-dependent cytotoxicity of OGD on SH-SY5Y Neuroblastoma cell. Cell viability was determined by the FACs analysis. The values are mean ± S.E. of three independent experiments. *P < 0.05 vs the control group.

SH-SY5Y cell은 기존의 포도당을 함유한 배지가 충분히 제거 되도록 포도당이 없는 DMEM 배지로 교체해 준다. 배지를 교체한 후, 각 시료 및 양성 대조군을 처리하였다. 그런 후에 plate를 혐기용 용기 (Modular incubator chamber (MIC-101), Billups-Rothenberg, Del Mar, CA, USA)로 옮기고 95% 질소와 5% CO₂ 혼합가스로 채워 밀폐한 후 37°C 배양기에서 20시간 배양하였다. 20시간 후, 각 well에 최종농도 4.5 mg/L로 포도당을 재처리하였고, 95% 공기와 5% CO₂ 가스를 공급하는 배양기로 옮겨줌으로써 24시간 동안 reoxygenation 해준다 (Tabakman *et al.*, 2005). FACs analysis를 통해 농도 별 세포의 사멸율을 cell고 세포 생존율(%)은 100(%) - 세포 사멸율(%)로 나타냈다. OGD와 reoxygenation의 시간은 55.5%의 세포 생존율을 나타내는 20시간과 24시간으로 각각 결정하였다 (Fig. 1).

4. FACs 분석

세포 사멸율을 측정하기 위해 채취한 세포를 PBS로 3회 세척한 후 차가운 70% 에탄올로 -20°C에서 24시간 고정시켰다. 이를 1000 rpm에서 5분간 원심 분리 하고 PBS로 씻어 준 후, 40 μg/ml의 Propidium Iodide (PI, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA)로 암실에서 30분간 염색하고 유세포 분석기 (FACs, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)로 세포 사멸율을 측정하였다. 세포 사멸이 일어난 세포는 PI 염색 강도가 감소하여 일반세포와 비교할 수 있다. 모든 시료는 duplicate로 측정하여 평균값을 산출하였고 세포 생존율(%)은 100(%) - 세포 사멸율(%)로 나타냈다. 세포 생존율로부터 EC₅₀의 값을 table curve 프로그램을 이용하여 계산하였다.

산소-포도당 결핍(OGD) 유도성 사멸에 대한 뇌 보호 효과를 가지는 생약추출물의 검색

Table 1. Neuroprotective effects of some plant extracts on OGD-induced cytotoxicity of SH-SY5Y Neuroblastoma cell. Data shown in the table are EC₅₀.

Scientific name	Family name	Part used	Habitat	EC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Positive Control (Carnosine)				15.2 ± 1.4
예덕나무 (<i>Mallotus japonicus</i>)	Euphorbiaceae	잎	Korea	> 100
예덕나무 (<i>Mallotus japonicus</i>)	Euphorbiaceae	줄기	Korea	> 100
산겨릅나무 (<i>Acer tegmentosum</i>)	Aceraceae	잎	Korea	> 100
산겨릅나무 (<i>Acer tegmentosum</i>)	Aceraceae	줄기	Korea	> 100
귀룽나무 (<i>Prunus padus</i>)	Rosaceae	전체	Korea	> 100
천궁 (<i>Cnidium officinale</i>)	Umbelliferae	근경	Japan	> 100
천궁 (<i>Cnidium officinale</i>)	Umbelliferae	근경	Korea	> 100
천궁 (<i>Cnidium officinale</i>)	Umbelliferae	근경	China	> 100
당귀 (<i>Angelica sinensis</i>)	Umbelliferae	뿌리	China	> 100
당귀 (<i>Angelica sinensis</i>) (주근)	Umbelliferae	뿌리	China	> 100
참당귀 (<i>Angelica gigas</i>)	Umbelliferae	뿌리	Korea	> 100
참당귀 (<i>Angelica gigas</i>) (당귀미)	Umbelliferae	뿌리	Korea	> 100
백작약 (<i>Paeonia japonica</i>)	Ranunculaceae	뿌리	Korea	> 100
백작약 (<i>Paeonia japonica</i>) (주초)	Ranunculaceae	뿌리	Korea	> 100
백작약 (<i>Paeonia japonica</i>) (초)	Ranunculaceae	뿌리	China	> 100
백작약 (<i>Paeonia japonica</i>) (햇별건초)	Ranunculaceae	뿌리	Korea	> 100
백작약 (<i>Paeonia japonica</i>)	Ranunculaceae	뿌리	China	> 100
으아리 (<i>Clematis mandshurica</i>)	Ranunculaceae	뿌리	China	> 100
천마 (<i>Gastrodia elata</i>)	Orchidaceae	근경	China	> 100
복령 (<i>Poria cocos</i>)	Polyporaceae	수피	China	> 100
복령 (<i>Poria cocos</i>)	Polyporaceae	전체	China	> 100
적복령 (<i>Poria cocos</i>)	Polyporaceae	전체	China	21.6 ± 1.9
원지 (<i>Polygala tenuifolia</i>) (거삼)	Polygalaceae	뿌리	China	> 100
원지 (<i>Polygala tenuifolia</i>)	Polygalaceae	뿌리	China	4.5 ± 0.6
원지 (<i>Polygala tenuifolia</i>) (거삼, 초)	Polygalaceae	뿌리	China	10.5 ± 0.7
원지 (<i>Polygala tenuifolia</i>)	Polygalaceae	뿌리	Korea	> 100
백선피 (<i>Dictamnus dasycarpus</i>)	Rutaceae	수피	China	7.9 ± 1.5
비수리 (<i>Lespedeza cuneata</i>)	Leguminosae	전체	Korea	> 100
고본 (<i>Ligusticum sinense</i>)	Umbelliferae	뿌리	China	> 100
고본 (<i>Angelica tenuissima</i>)	Umbelliferae	뿌리	Korea	> 100
두충 (<i>Eucommia ulmoides</i>)	Eucommiaceae	수피	Korea	> 100
두충 (<i>Eucommia ulmoides</i>)	Eucommiaceae	잎	Korea	> 100
두충 (<i>Eucommia ulmoides</i>)	Eucommiaceae	가지	Korea	18.4 ± 1.9
두충 (<i>Eucommia ulmoides</i>) (초)	Eucommiaceae	수피	Korea	19.6 ± 0.3
까마귀밥나무 (<i>Ribes fasciculatum</i> var. <i>Chinense</i>)	Saxifragaceae	줄기	Korea	> 100
은행나무 (<i>Ginkgo biloba</i>)	Gingkoaceae	뿌리	Korea	> 100
석창포 (<i>Acorus gramineus</i>)	Araceae	근경	China	> 100
참취 (<i>Aster scaber</i>)	Compositae	전체	Korea	> 100
할미꽃 (<i>Pulsatilla koreana</i>)	Ranunculaceae	전체	Korea	> 100
진득찰 (<i>Siegesbeckia glabrescens</i>)	Compositae	전체	Korea	> 100
우산나물 (<i>Syneilesis palmate</i>)	Compositae	전체	Korea	> 100
고삼 (<i>Sophora flavescens</i>)	Leguminosae	뿌리	China	30.7 ± 3.9
왕대 (<i>Phyllostachys bambusoides</i>)	Gramineae	잎	Korea	> 100
왕대 (<i>Phyllostachys bambusoides</i>)	Gramineae	줄기	Korea	> 100
석잠풀 (<i>Stachys riederi</i> var. <i>japonica</i>)	Labiatae	전체	China	> 100
광나무 (<i>Ligustrum japonicum</i>)	Oleaceae	잎	Korea	> 100

*EC₅₀ : Half maximal effective concentration

*The values are mean ± S.E. of three independent experiments.

Table 2. Neuroprotective effects of polygala tenuifolia fractions on OGD-induced cytotoxicity of SH-SY5Y Neuroblastoma cell. Data shown in the table are EC₅₀.

Scientific name	Part used	Habitat	Fraction	EC ₅₀ (μg/ml)
원지 (<i>Polygala tenuifolia</i>)	뿌리	China	Hexane	1.4 ± 0.2*
			Chloroform	>100
			Ethyl acetate	3.6 ± 0.7
			H ₂ O	>100

*The values are mean±S.E. of three independent experiments.

결과 및 고찰

두충 (*Eucommia ulmoides*) 등 25종 46가지의 생약과 부위별 성분 차이가 많이 나는 종의 각 부위별 MeOH 추출물을 대상으로 하였으며, 몇몇 시료들은 한방 원리에 의해 약효가 달라지는 심을 제거한 걸껍질 (거심)을 사용하거나, 볶아서 사용하거나 (초), 다른 시료들 (음건)과 달리 햇볕건조, 또는 술에 담근 후 말려서 볶는 (주초) 등의 방법으로 각각의 효과를 알아보았다. 이들 각각의 시료가 human SH-SY5Y neuroblastoma cell에서 산소-포도당 결핍 유도성 세포 사멸에 미치는 뇌 보호 효과는 EC₅₀ 값을 지표로 하여 비교해 보았다. 각 생약 시료 및 carnosine은 각각 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 μg/ml의 농도로 세포 생존율을 test한 결과 7가지의 추출물에서 농도 구배에 맞게 효과를 보여 Human SH-SY5Y neuroblastoma cell에 산소-포도당 결핍으로 유도되는 손상에 대한 보호 활성을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 양성 대조군으로는 pure compound인 carnosine을 사용하였으며 EC₅₀ 값은 15.20 μg/ml가 나왔으며 원지 (*Polygala tenuifolia*) (뿌리), 백선피 (*Dictamnus dasycarpus*) (수피), 원지 (*Polygala tenuifolia*) (거심, 초) (뿌리), 두충 (*Eucommia ulmoides*) (가지), 두충 (*Eucommia ulmoides*) (초) (수피), 적복령 (*Poria cocos*) (전체), 고삼 (*Sophora flavescens*) (뿌리) 등의 MeOH 추출물에서 각각 4.5 ± 0.6, 7.9 ± 1.5, 10.5 ± 0.7, 18.4 ± 1.9, 19.6 ± 0.3, 21.6 ± 1.9과 30.7 ± 3.9 μg/ml의 EC₅₀ 값의 효과를 보였다. 이 생약들의 분리하여 활성물질을 탐색하고자, 먼저 뇌 보호 활성이 가장 좋았던 원지 (*Polygala tenuifolia*) (뿌리)의 MeOH 추출물을 n-hexane, chloroform, ethyl acetate 층의 세부 분획물로 나누어 산소-포도당 결핍으로 유도되는 손상에 대한 보호 활성을 측정하였다. Table 2에서와 같이 원지의 hexane과 ethyl acetate 층에서 1.4 ± 0.2와 3.6 ± 0.7 μg/ml의 EC₅₀ 값을 보여 원지의 세부 분획물에서 뇌 보호 활성 증진을 확인할 수 있었으며 활성물질을 찾아내고자 더욱 세부 분획의 연구를 진행할 예정이다. 또한 이미 백서 뇌허혈 동물 모델에서 대뇌피질 세포 사멸에 대한 억제 효과를 가지는 것으로 알려진 고삼 (*Sophora flavescens*) (뿌리) (Park et al., 2009) 을 제외한 나머지 생약시료의 세부 분획 추출물에 대한

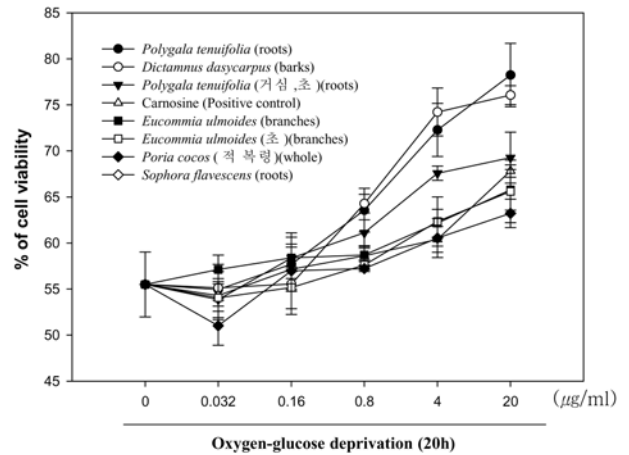


Fig. 2. Neuroprotective effects of seven plant extracts and carnosine on OGD-induced cytotoxicity of SH-SY5Y Neuroblastoma cell. Cell viability was determined by the FACS analysis. The values are mean ± S.E. of three independent experiments.

효과도 연구 중에 있다. 그리고 본 연구실에서 선행 연구를 통해 동물모델에서 효과가 입증된 시료 농도인, 10 μg/ml 보다 낮은 농도에서 EC₅₀ 값의 효과를 보여준 생약시료들은 동물모델에서의 효과가 있을 것으로 예상 되어 백서의 대뇌 피질을 이용한 산소-포도당 결핍 유도 모델과 (Mosmann, 1983; Siqueira et al., 2004), MCAO (middle cerebral artery occlusion)로 유도된 뇌 허혈 동물 모델에도 (Longa et al., 1989) 적용하고자 한다.

이 중 원지 (*Polygala tenuifolia*) (뿌리), 백선피 (*Dictamnus dasycarpus*) (수피), 원지 (*Polygala tenuifolia*) (거심, 초) (뿌리)의 MeOH 추출물의 경우 양성대조군 carnosine의 EC₅₀ 값인 15.20 μg/ml 보다 낮은 농도에서 EC₅₀ 값의 효과를 보였고, 두충 (*Eucommia ulmoides*)은 특히 가지 부분에서 높은 활성 효과를 보였으며 수피 부위는 볶아서 사용한 초에서 효과를 보여, 앞으로 각 세부 분획물의 성분 차이나 한방 원리에 따른 독성 감소등과 관련된 세부 실험을 진행할 예정이다. 그리고 적복령 (*Poria cocos*)은 선행 연구에서 백출 (*Attractylodes macrocephala*), 당귀 (*Angelica sinensis*)와 함께 처리할 경우, 산화적 스트레스로 유발되는 뇌허혈에 대한 보호 효과와 뇌조

직 손상의 억제에 대한 효과가 입증되었으며 (Lin *et al.*, 2008), 대뇌혈류 증가에 효능이 있고 (Jingyi *et al.*, 1997), 항 산화효과 및 항 염증에 효과가 있는 것으로 보고되어 있어 (Schinella *et al.*, 2002) 위 시료들 중 향후 활성물질을 탐색한다면 뇌 허혈로 유발되는 뇌신경 관련 질환에 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 본다. 그래서 본 연구소에서는 적복령 (*Poria cocos*)의 세부 분획 추출물에 대한 효과를 연구 중에 있으며 뇌허혈 동물모델에서의 효과 또한 연구 중에 있다.

감사의 글

본 연구는 국립 산림 과학원의 연구비 지원(FP0702-2008-01)을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Goldberg MP and Choi DW.** (1993). Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *Journal of neuroscience.* 13:3510-3524.
- Jingyi W, Yasuhiro M, Naoya H, Seok RC, Yoshiharu Y, Nagara T, Fumiko T, Shigeru M and Junji K.** (1997). Observation on the effects of Chinese medicine zhenxuanyin for improving cerebral blood flow in rats with cerebral ischemia. *Journal of traditional Chinese Medicine.* 17:299-303.
- Lin Z, Zhu D, Yan Y and Yu B.** (2008). Herbal formula FBD extracts prevented brain injury and inflammation induced by cerebral ischemia-reperfusion. *Journal of Ethnopharmacology.* 118:140-147.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S and Cummins R.** (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20:84-91.
- Min J, Senut MC, Rajanikant K, Greenberg E, Bandagi R, Zemke D, Mousa A, Kassab M, Farooq MU, Gupta R and Majid A.** (2008). Differential neuroprotective effects of carnosine, anserine, and *N*-acetyl carnosine against permanent focal ischemia. *Journal of Neuroscience Research.* 86:2984-2991.
- Mosmann T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods.* 65:55-63.
- Park SJ, Nam KW, Lee HJ, Cho EY, Koo U and Mar W.** (2009). Neuroprotective effects of an alkaloid-free ethyl acetate extract from the root of *Sophora flavescens* Ait. against focal cerebral ischemia in rats. *Phytomedicine.* 16:1042-1051.
- Rajanikant GK, Zemke D, Senut MC, Frenkel MB, Chen AF, Gupta R and Majid A.** (2007). Carnosine is neuroprotective against permanent focal cerebral ischemia in mice. *Stroke.* 38:3023-3031.
- Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich de Buschiazzo P and Rios JL.** (2002). Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sciences.* 70:1023-1033.
- Siqueira IR, Cimarosti H, Fochesatto C, Nunes DS, Salbego C, Elisabetsky E and Netto CA.** (2004). Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life Sciences.* 75:1897-1906.
- Strasser U and Fischer G.** (1995). Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *Journal of Neuroscience Methods.* 57:177-186.
- Tabakman R, Jiang H, Shahar I, Arien-Zakay H, Levine RA and Lazarovici P.** (2005). Neuroprotection by NGF in the PC12 in vitro OGD model: involvement of mitogen-activated protein kinases and gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1053:84-96.