افزایش تقویت سیناپسی طولانی مدت هیپوکمپ در مهار منتشر شونده ی قشری در موش های نوجوان

Long-Term Potentiation Enhanced in Juvenile Rat by Repetitive Cortical Spreading Depression

میلاد احمدی[۱،۲]، مهرناز بنازاده دردشتی[۱]، سید مصطفی مدرس موسوی[۱]، فریبا کریم زاده[۱،۳]

۱. مرکزتحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران.
۲. دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
۳. دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

Milad Ahmadi[1,2], Mehrnaz Banazadeh Dardashti[1], Sayed Mostafa Modarres Mousavi[1], Fariba Karimzadeh[1,3]

1. Shefa Neuroscience Research Center, Khatam-al-Anbia Hospital, Tehran, Iran.
2. Faculty of Verterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
3.School of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

اطلاعات مقاله
دریافت: ۱۸ اردیبهشت ۱۳۹۲
پذیرش: ۲۷ خرداد ۱۳۹۲

کلید واژه:
تقویت سیناپسی طولانی مدت،
یادگیری،
حافظه،
پلاستیسیته نورونی،
هیپوکمپ.

چکیده

مقدمه مهار منتشر شونده (SD) یک پدیده ی بیوالکتریک است که در سیستم اعصاب مرکزی ایجاد می گردد و در پاتوفیزیولوژی بعضی از اختلالات عصبی نقش ایفا می کند. مطالعه ی حاضر، به بررسی اثرات مکرر SD بر اختلالات یادگیری و حافظه از طریق تقویت سیناپسی طولانی مدت در هیپوکمپ پرداخته است. مواد و روش ها الکترودهای نقره ی ثبت و کانول راهنما در مغز موش های نوجوان جایگذاری شدند. القا SD با تزریق محلول ۳ مولار KCl از طریق کانول راهنما هفته ای یک بار به مدت چهار هفته صورت گرفت. بعد از ۴ هفته مغز آن ها بیرون آورده شد و از هیپوکمپ آن ها برش های بافتی تهیه و در مایع مغزی نخاعی نگهداری شد. تحریک های الکتریکی منفرد توسط یک الکترود دوقطبی به ناحیه ی Schaffer collateral هیپوکمپ داده شد. پتانسیل پس سیناپسی تحریکی میدانی (fEPSP) توسط تحریکات متوالی با شدت ۵۰ درصد جمعیت نیزه های ظاهر شده بر انگیخته شد. یافته ها مهار منتشر شونده مکرر باعث افزایش LTP در ناحیه ی CA1 هیپوکمپ گردید. داده ها افزایش معناداری را در دامنه fEPSP های ناحیه ی CA1 هیپوکمپ نسبت به سطح پایه داشت. نتیجه گیری شاید یافته های ما بتواند بیانگر پاتوفیزیولوژی نقصان حافظه در بعضی از اختلالات عصبی در کودکان باشد.

Article info:
Received: 8 May 2013
Accepted: 17 Jun. 2013

Key words:
Long-Term Potentiation,
Learning,
Memory,
Neuronal Plasticity,
Hippocampus.

ABSTRACT

Introduction Spreading depression (SD) is a bioelectrical event in the central nervous system and involves in the pathophysiology of some neurological disorders. In this present study, we indicate enhancement of long-term potentiation of hippocampus tissue in juvenile rats faced to cortical spreading depression repetitively. Materials and Methods Silver recording electrodes as well as a cannula were implanted over the brain of juvenile rats. Repetitive cortical SD events were induced by KCl 3 M weekly injection through the cannula. The brains were removed after 4 weeks. Transverse sections were prepared and incubated in artificial cerebrospinal fluid. Single electrical stimulations were applied through a bipolar electrode placed on to the hippocampal Schaffer collaterals. The field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) were elicited by adjusting the intensity of stimulation to 50% of that at which population spikes began to appear. Results Repetitive SD enhanced the long-term potentiation in CA1 hippocampal area. The data indicate that repetitive cortical SD in juvenile rats significantly increases the amplitude of the fEPSP form the baseline. Conclusion This may clarify the pathophysiology of memory deficit were seen in some neurological disorders in children.

• نویسنده مسئول:
فریبا کریم زاده
آدرس الکترونیکی: Fariba_karimzade@yahoo.com

** Corresponding Author:*
Fariba Karimzadeh
E-mail: Fariba_karimzade@yahoo.com

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.1.3.33]

مقدمه

در جریان بیماری های سیستم اعصاب مرکزی مانند صرع، میگرن، بیماری های عروقی مانند ایسکمی، آسیب های مغزی و فراموشی های گذرا یک دپلاریزاسیونی رخ می دهد که ایجاد پدیده ای منتشر به نام مهار منتشر شونده (SD) را می کند (۱). مطالعات اخیر نشان داده اند که SD هم در نورون ها و هم در سلول های گلیال اتفاق می افتد. چه در موجوداتی که مغز آنان دارای چین و شکنج است و چه در موجوداتی که مغز آنان دارای چین وشکنج نیست می تواند ایجاد شود (۴-۲). پدیده SD در نواحی خاکستری مغز متعاقب تحریکات شیمیایی، مکانیکی و الکتریکی ایجاد می شود (۵ ،۲). این رخداد پاتوفیزیولوژیک، به صورت گذرا باعث تحریک پذیری بیش از حد و کاهش شدید فعالیت سلول های عصبی می شود (۲). انتشار SD به آرامی و به همراه تغییرات یونی و متابولیکی اتفاق می افتد (۶). رها شدن پتاسیم و هیدروژن در فضای بین نورونی و بلافاصله ورود سدیم، کلر و کلسیم به داخل سلول های عصبی باعث ایجاد افزایش میزان نفوذ پذیری آب شده و متعاقب آن تورم نورونی و کاهش فضای بین سلولی می گردد که باعث یک دپلاریزاسیون ادامه دار می گردد (۷ ،۲). بر اساس یافته ها در SD رها شدن نوروترنسمیترهای مغزی مهاری و تحریکی از جمله گلوتامات، گابا و سروتونین دستخوش تغییر می شوند (۱۰-۸). این تغییرات در نواحی مختلفی از جمله هیپوکمپ، مخچه، هسته دمدار، تکتوم، تالاموس، پیاز بویایی و اجسام مخطط رخ می دهد (۱۱). تاثیرات SD به خصوص SD های مکرر بر یادگیری و حافظه هنوز مورد بحث می باشد (۱۲). هیپو کمپ یکی از آن مناطق می باشد که حافظه در آن شکل می گیرد و SD در آن رخ می دهد (۱۴ ،۱۳). این مطالعه با توجه به نتایج متناقض در مورد اثرات مکرر SD بر حافظه قصد دارد از طریق بررسی پتانسیل طولانی مدت (LTP)، یک شکل از پلاستیسیته سیناپسی، را در ناحیه Schaffer collateral تشکیلات هیپوکمپ موش صحرایی به دنبال SD مکرر بررسی کند.

مواد و روش ها

حیوانات

در پژوهش حاضر تعداد ۴۰ عدد موش صحرایی نر نوجوان ۲۵ تا ۳۰ روزه از نژاد ویستار (Wistar Rat) در محدوده ی وزنی ۵۰ الی ۷۵ گرم که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند، مورد استفاده قرار گرفته بودند. حیوانات تحت دمای ۲±۲۲ درجه ی سانتی گراد، و رطوبت کنترل شده و سیکل روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار داشتند. همه حیوانات در قفس هایی از جنس پلی کربنات نگهداری می شدند و دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. کلیه مراحل تحقیق طبق دستورالعمل کار با حیوانات آزمایشگاهی و تحت نظر کمیته ی نگهداری و حمایت از حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تهران صورت گرفت.

حیوانات به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. گروه کنترل که هیچ مداخله و جراحی در آن ها صورت نگرفت. گروه شاهد که در حیوانات این گروه کاشت الکترودهای ثبات و کانول راهنما صورت پذیرفت و محلول نرمال سالین به طور هفتگی از طریق کانول راهنما تزریق گردید. گروه SD که مانند گروه شاهد تحت کاشت الکترود و کانول راهنما قرار گرفت. به منظور القا SD محلول ۳ میلی مولار KCL از طریق کانول راهنما به طور هفتگی تزریق شد.

جراحی

حیوانات ابتدا با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین (۱۵۰ mg/kg) و زایلازین (۰/۱ mg/kg) بیهوش شده و مورد عمل جراحی قرار گرفتند. در این کار، یک عدد کانول راهنما از جنس استیل از سر سوزن های شماره ی ۲۳ و دو الکترود نقره به طول (۳ mm-۲) در ناحیه کورتکس حسی پیکری و یک الکترود نقره بر روی پیاز بویایی کاشته شد. این کانول و الکترود ها توسط دو عدد پیچ عینک و با استفاده از آکریل دندانپزشکی در محل خود محکم می شدند.

القای SD

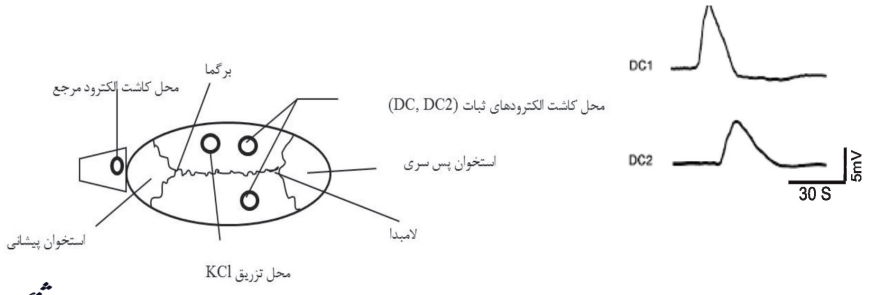
بعد از یک هفته ریکاوری، حیوانات با پنتوباربیتال سدیم (۶۰ mg/kg) بیهوش شده و در این حین ثبت ECoG پایه جهت نمایش SD گرفته می شد. تزریق KCl 3 M به میزان ۱۵-۱۰میکرولیتر به داخل این ناحیه با یک کانول از جنس استیل به شماره ی ۳۰ میلی متر که به یک سرنگ هامیلتون ۱۰ µl با استفاده از یک کانول پلاستیکی وصل بود، در مدت یک دقیقه انجام می گرفت. سپس یک دقیقه ی دیگرکانول تزریق در محل باقی می ماند تا از بیرون زدن KCl جلوگیری شود. القایSD (تزریق KCl) به مدت ۴ هفته به صورت مکرر و مرتب انجام گردید. پس از پایان آزمایش ها، به منظور تعیین محل تزریق دارو، تعدادی از حیوانات کشته شده توسط نرمال سالین و پارافرمالدهید ۱ ٪ پرفیوژن شدند و بعد از طی مراحل فیکس بافتی، این مغزها برش داده شده و محل تزریق با استفاده از رنگ تلوئیدن بلو مشخص می شد.

آماده سازی بافت

موش ها با اتر در دسیکاتور بیهوش و سپس سر موش ها جدا شده و مغز به سرعت از جمجمه خارج و داخل مایع مغزی نخاعی (ACSF)[۱] سرد و اکسیژنه قرار داده شد. برش های عرضی مغز به ضخامت ۵۰۰ µm، با استفاده از دستگاه برش بافتی (Vibratome 3000, The VibratomeCo., St. Louis, Mo) تهیه شد. برش ها در محفظه ی انکوباسیون ACSF حاوی اکسیژن با دمای ۳۱ درجه سانتی گراد به مدت حداقل ۱ ساعت قرار داده شدند و سپس به محفظه ی ثبت الکتروفیزیولوژی

۱. Artificial cerebrospinal fluid

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-04]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.1.3.33]



تصویر ۱. جهت تزریق KCl ۳ مولار یک عدد کانول راهنما از جنس استیل از سرسوزن های شماره ی ۲۳ و دو الکترود نقره به طول (۳- ۲ میلی متر) در ناحیه ی کورتکس حسی پیکری و یک الکترود نقره بر روی پیاز بویایی کار گذاشته می شود. سرعت انتشار نوسانات DC منفی بین الکترودها ۰/۳±۳ میلی متر / دقیقه است.

منتقل شدند که دمای آن در محدوده ی ۳۱- ۲۹ درجه ی سانتی گراد کنترل می شود و ACSF اکسیژنه با سرعت ml/min ۲/۵ از آن عبور داده می شد. ترکیب ACSF بر حسب میلی مول (mM) شامل $CaCl_2$, 1; NaH_2PO_4, 1.24; MgSO4, 1.3; NaHCO3, 26; NaCl, 124; KCl, 4; Glucose, 10 در pH 7.4 می باشد. بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون غلظت محلول $CaCl_2$ درACSF به دو میلی مولار رسانده می شود.

ثبت LTP[۲]

بعد از حدود ۱ ساعت برش ها به صورت جداگانه به داخل محفظه ی ثبت منتقل شدند. در داخل محفظه ی ثبت ACSF اکسیژنه ۳۲ درجه ی سانتی گراد جریان داشته و برش ها پس از انتقال به مدت ۲-۱/۵ دقیقه در محفظه استراحت می کنند. جهت ثبت پتانسیل خارج سلولی در منطقه CA1 در ناحیه ی هیپوکمپ از میکرو الکترود های شیشه ای که با محلول 150 NaCl میلی مولار پر شده و مقاومت آن ۱۰-۲ ΩM می باشد، استفاده گردید. این الکترود با اتصال به الکترودی از جنس Ag/AgCl-KCl سیگنال ها را به یک آمپلی فایر منتقل می کند. سیگنال های به دست آمده، از طریق دستگاه مبدل آنالوگ به دیجیتال Digidata 1200 (Axon Instrument, CA, USA) به کامپیوتر منتقل و توسط نرم افزار(Axon Instrument, CA, USA) AxoScope10 آنالیز می گردد.

تحریک های الکتریکی منفرد (0.05-0.1 Hz) توسط یک الکترود دوقطبی از جنس پلاتین، در ناحیه Schaffer collateral هیپوکمپ اعمال می شدند. پتانسیل پس سیناپسی تحریکی میدانی (fEPSP) با تنظیم شدت تحریک تا ۵۰ ٪ از ظاهر شدن تجمعی اولین امواج به دست آمدند. هیپوکمپ در هر ۲ دقیقه یک بار مورد تحریک قرار می گرفت. زمانی تحریکات مکرر (Tetanic) آغاز می شدند که fEPSP ها به یک میزان مشخص و پایدار می رسیدند و حداکثر اختلافش ۵٪ می شد و حداقل برای ۳۰ دقیقه ادامه داشت. جهت ایجاد امواج بعد از ۱۰ قطارموج[۳]، ۴ پالس به میزان ۱۰۰ Hz در ۲۰۰ ms در ناحیه ی Schaffer collateral هیپوکمپ ایجاد می شد. دوره ی تحریک برای هر پالس مشابه پالس های اعمال شده در وضعیت پایه بود. در LTP پاسخ به تحریک پایه در ۵ شیب متوالی fEPSP بعد از ۳۰ دقیقه از زمان امواج tetanic و ۵ شیب بلافاصله قبل از امواج tetanic مورد بررسی قرار گرفت.

محاسبات آماری

در این مطالعه نتایج به صورت میانگین± انحراف از معیار آورده شده است. برای تجزیه و تحلیل نتایج از آزمون ANOVA یک طرفه توسط تست تعقیبیTukey استفاده گردید.

یافته ها

تغییرات ثبت امواج مغزی EEG

تزریق KCl داخل مغز، یک نوسان منفی موج DC در تمامی حیوانات مورد آزمایش قرار گرفته، ایجاد نمود. متوسط دامنه و میانگین طول مدت مرحله اول امواج SD به ترتیب ۱۳/۸±۲/۱ mV و ۱۳۲±۲۳ s می باشد. سرعت انتشار نوسانات DC منفی بین الکترودها ۰/۳±۳ میلی متر / دقیقه بود (تصویر ۱). دامنه و مدت زمان و همچنین سرعت انتشار SD در ۴ هفته ی القا شده تفاوت معنا داری با هم نداشتند. با این حال، تعداد SD های ناشی از تزریق KCl از نظر آماری در طول چهار هفته آزمایش افزایش یافته اند. تعداد امواج SD ثبت شده در طی ۴ هفته عبارت از ۰/۳ ±۱/۵در هفته اول، ۰/۲ ± ۱/۹ در هفته دوم، ۰/۳±۲/۴ در هفته سوم و در هفته چهارم۰/۳±۳ بود.

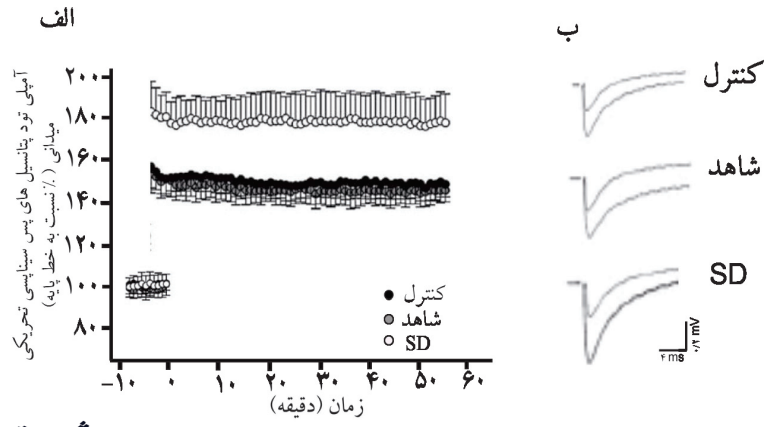
تغییرات پلاستیسیته سیناپسی

تحریک در مسیر Schaffer collateral صورت گرفته و ثبت در منطقه ی لایه ی هرمی CA1 هیپوکمپ انجام شد. بعد از پایدار

۲. Long-term potentiation

۳. Tetanic wave

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-04]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.1.3.33]



تصویر ۲. تاثیر مهار منتشر شونده ی مکرر (SD) بر پتانسیل طولانی مدت LTP و میزان پتانسیل های پس سیناپسی تحریکی میدانی fEPSP در موش های نوجوان. الف- امواج Tetanic بعد از ۱۰ قطارموج، ۴ پالس به میزان ۱۰۰ Hz در ۲۰۰ ms که نتیجه نهایی آن تولید یکسری موج با خصوصیات یکسان می شود و به صورت درصدی، میانگین شیب fEPSP ها نسبت به سطح پایه محاسبه می شود. با توجه به نقاط زمانی، تحریکات tetanic صورت گرفت. ب- به ترتیب یک نمونه از fEPSP های قبل و بعد از القای امواج تحریکی tetanic در گروه های شاهد، کنترل و SD در برش های هیپو کمپ قرار داده شده است.

شدن دامنه های fEPSP برای حداقل ۳۰ دقیقه به عنوان سطح پایه، امواج تحریکی titanic به Schaffer collateral فرستاده می شود. همچنین هر پالس به صورت یکسان از سطح پایه فاصله داشته است. دامنه ی fEPSP ها در دقیقه های ۳-۲ افزایش پیدا می کرد و در دقایق ۶-۵ بعد از امواج tetanic به پایداری می رسیدند. تفاوت معناداری در دامنه fEPSP های گروه های نرمال و شاهد وجود نداشت. تحریکات tetanic در گروه های نرمال و شاهدی که رینگر تزریق شده بود به ترتیب ۷±۱۴۱و ۸±۱۳۷درصد نسبت به سطح پایه افزایش داشتند. القای LTP در گروهی که KCl دریافت کرده بود به صورت هفتگی، افزایش معناداری را در دامنه fEPSP ها به میزان ۱۶±۱۷۸ درصد نسبت به گروه شاهد که رینگر دریافت کرده بود و کنترل، نشان می داد (تصویر ۲).

بحث و نتیجه گیری

مطالعه ی حاضر اثرات مکرر مهار منتشر شونده را در طول ۴ هفته بر میزان پتانسیل های پس سیناپسی در تشکیلات هیپوکمپ بعد از تحریک الکتریکی مسیر Schaffer collateral در موش های نوجوان مورد مطالعه قرار داده و نشان دهنده این است که SD موجب آسیب LTP القاء شده با تحریک tetanic ۱۰۰ Hz گشته و باعث بیشتر کردن دامنه fEPSP ها می گردد. در SD، رها شدن نوروترنسمیترهای مغزی مهاری و تحریکی از جمله گلوتامات، گابا و سروتونین دستخوش تغییر می شوند (۹-۷). همچنین یکی از مهمترین گیرنده های مغزی که تغییر می کند گیرنده های گلوتاماترژیکی از جمله N- متیل DL آسپارتات (NMDA) است که در انعطاف پذیری سیناپسی یادگیری و حافظه نقش مهمی ایفا می کند (۱۷-۱۵). تحقیقات اخیر نشان داده که SD باعث افزایش فعالیت گیرنده های NMDA می شود (۱۸) و همچنین با بلاک کردن این گیرنده از میزان SD در مغز کاسته می شود (۱۰).

در سال ۲۰۰۶ ورنسمن و همکاران در مطالعه ای نشان دادند که SD باعث تقویت قدرت سیناپسی می گردد (۱۹) که با معنادار بودن fEPSP گروه SD تزریق KCl همخوانی دارد. یک سال بعد گروهی دیگر در مغز بیماران میگرنی و مصروع مطالعه ی مشابهی انجام دادند که بیش تحریکی را نشان می داد (۲۰) و افزایش fEPSP را نسبت به سطح پایه توجیه می کند.

لذا مضر بودن امواج SD به صورت مکرر در موش های نوجوان در تحقیق حاضر مشخص گردیده و در سطح میانی رشد مغزی باعث اثرات غیر قابل جبرانی بوده و می تواند این اختلال در کودکان در حال رشد، بیماری های عصبی جدی و ضررهای غیر قابل برگشتی داشته باشد.

منابع

1. Gorji A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. Brain Res Rev. 2001; 38(1): 33-60.

2. Smith JM, Bradley DP, James MF, Huang CLH. Physiological studies of cortical spreading depression. Biol Rev. 2006; 81(4): 457-81.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.1.3.33]

3. Bures J. Buresova 0, Krivanek J. The mechanism and applications of Leao`s spreading depression of electroencephalographic activity. Publ House Czech Acad Sci, Prague. 1974: p.410

4. Wiggins AK, Shen PJ, Gundlach AL. Neuronal-NOS adaptor protein expression after spreading depression: implications for NO production and ischemic tolerance. J Neurochem. 2003; 87(6): 1368-80.

5. Sachs M, Pape H-C, Speckmann E-J, Gorji A. The effect of estrogen and progesterone on spreading depression in rat neocortical tissues. Neurobiol Dis. 2007; 25(1): 27-34.

6. Hansen AJ, Zeuthen T. Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. Acta Physiol Scand. 1981; 113(4): 437-45.

7. Alberts B WJ, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. 2008.

8. Krüger H, Luhmann HJ, Heinemann U. Repetitive spreading depression causes selective suppression of GABAergic function. Neuroreport. 1996; 7(15-17): 2733-6.

9. Stefulj J, Bordukalo-Niksic T, Hecimovic H, Demarin V, Jernej B. Epilepsy and serotonin (5HT): variations of 5HT-related genes in temporal lobe epilepsy. Neurosci Lett. 2010; 478(1): 29-31.

10. Marrannes R, WillemsR, De Prins E, Wauquier A. Evidence for a role of the N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. Brain res. 1988; 457(2): 226-40.

11. Leao AA. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. J Neurophysiol. 1944.

12. Bureš J, Burešova O. Cortical spreading depression as a memory disturbing factor. J Comp Physiol Psych. 1963; 56(2): 268.

13. Olesen J, Jørgensen MB. Leao`s spreading depression in the hippocampus explains transient global amnesia. Acta Neurol Scand. 1986; 73(2): 219-20.

14. Barnes C. Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat. Trends Neurosci. 1988; 11(4): 163-9.

15. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature. 1993; 361(6407): 31-9.

16. Abraham WC, Bear MF. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. Trends Neurosci. 1996; 19(4): 126-30.

17. Massey PV, Johnson BE, Moult PR, Auberson YP, Brown MW, Molnar E, et al. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. J Neurosci. 2004; 24(36): 7821-8.

18. Sadeghian H, Jafarian M, Karimzadeh F, Kafami L, Kazemi H, Coulon P, et al. Neuronal death by repetitive cortical spreading depression in juvenile rat brain. Exp Neurol. 2012; 233(1): 438-46.

19. Wernsmann B, Pape HC, Speckmann EJ, Gorji A. Effect of cortical spreading depression on synaptic transmission of rat hippocampal tissues. Eur J Neurosci. 2006; 23(5): 1103-10.

20. Berger M, Speckmann EJ, Pape H, Gorji A. Spreading depression enhances human neocortical excitabilityin vitro. Cephalalgia. 2008; 28(5): 558-62.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-04]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.1.3.33]