

## اثر تجویز خوراکی مورفین بر باروری موشهای سوری نژاد Balb/c

هدایت صحرائی (Ph.D.)<sup>۱</sup>، غلامرضا کاکا (M.S.)<sup>۲</sup>، حسن قشونی (M.S.)<sup>۳</sup>، مریم شمس لاهیجانی (Ph.D.)<sup>۴</sup>، مینا رضانی (M.S.)<sup>۵</sup>.

- ۱- استادیار، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران.
- ۲- مربی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران.
- ۳- مربی، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران.
- ۴- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
- ۵- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال، تهران، ایران.

### چکیده

مواد اعتیادآور علاوه بر اثرات سوء بر جنین افراد بالغ می‌توانند با اثر بر ترشح هورمونهای جنسی و هیپوفیزی سبب کاهش تعداد سلولهای جنسی و نیز میل جنسی شده و به این ترتیب باعث ایجاد ناباروری شود. هدف از این پژوهش بررسی اثرات اعتیاد به مورفین با روش خوراکی در القاء ناباروری در موش سوری نژاد Balb/c می‌باشد. برای انجام این مطالعه، از یک گروه کنترل ( $n=6$ ) و بیست و یک گروه آزمایشی ( $n=363$ ) استفاده شد. سپس مورفین خوراکی با سه غلظت آغازین:  $0.1$ ،  $0.01$  و  $0.001$  mg/ml طی یک دوره سه هفته‌ای به موشها تجویز و سپس موشهای نر و ماده با هم جفت شدند. در روز هفدهم بارداری ابتدا موشهای ماده با اتر بیهوش شده و سپس رحم آنها برای بررسی تعداد جنین‌ها با عمل جراحی خارج شد. آزمایشات نشان دادند که شانس بارداری در تمام گروهها نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد و این کاهش در گروهی که مورفین را با دوز  $0.1$  mg/ml دریافت کرده‌اند بسیار بیشتر است. بنابراین بر اساس نتایج حاصل می‌توان نتیجه گرفت که مورفین بشدت شانس بارداری را در موشها کاهش داده و می‌تواند سبب کاهش باروری گردد و این امر می‌تواند در مورد انسانها نیز صادق باشد.

کل واژگان: مورفین، موش سوری، ناباروری، اعتیاد و مواد مخدر.

آدرس مکاتبه: دکتر هدایت صحرائی، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، صندوق پستی ۶۵۰۸-۱۹۳۹۶، تهران، ایران.

پست الکترونیک: h.sahraei@bmsu.ac.ir

## مقدمه

استفاده از داروهای مخدر در جوامع انسانی گسترش زیادی یافته است (۱). اکثر افراد معتاد در سنین باروری و دارای زندگی مشترک بوده و احتمال تولد فرزند در آنها زیاد است. این در حالی است که تحقیقات مختلف بیانگر تأثیر سوء مواد مخدر بر هورمونهای جنسی و سلولهای جنسی و در نتیجه بر توانایی تولید مثل در این افراد می‌باشد. برای مثال مطالعات مختلف نشان داده است که تجویز مورفین در دوران بارداری سبب اختلال در سیکل جنسی در موشهای ماده می‌گردد (۲). همچنین بدنبال تزریق مورفین تعداد فرزندان مرده موشهای بزرگ<sup>۱</sup> آزمایشگاهی نیز افزایش می‌یابد. از سوی دیگر در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که سطح پلاسمایی استرادیول و همچنین بدنبال تزریق مورفین در موشهای ماده وزن تخمدان بشدت کاهش می‌یابد (۳). بایستی اشاره کرد که در موشهای تیمار شده با مورفین میزان نوراپینفرین هیپوتالاموس کاهش می‌یابد که این می‌تواند منجر به کاهش میل جنسی در موشهای ماده گردد (۳). از سوی دیگر تیمار با مورفین در دوران بارداری و شیردهی سبب افزایش تعداد جنین‌ها و نوزادان مرده می‌شود (۴-۵). همچنین تجویز مورفین نقایص زیادی در جنین نر ایجاد می‌کند، برای مثال جنین‌هایی که مادران آنها در دوران بارداری مورفین دریافت کرده‌اند با عارضه نهان بیضه‌ای<sup>۲</sup> متولد شده و این امر خود می‌تواند به عدم باروری در هنگام بلوغ منجر شود (۶). با توجه به مطالب فوق به نظر می‌رسد که مورفین بعنوان یک داروی مخدر سبب بروز ناتوانی جنسی در حیوانات گردد. سؤالی که مطرح می‌گردد این است که آیا مورفین بر احتمال بارداری پستانداران مؤثر است. بدین منظور در تحقیق حاضر تأثیر تجویز خوراکی مورفین بر میزان بارداری

موشهای سوری از نژاد balb/c در گروههای مختلف مورد مطالعه قرار گرفت.

## مواد و روشها

**حیوانات:** موشهای کوچک آزمایشگاهی نژاد balb/c با میانگین وزنی ۲۵-۲۰ گرم در این آزمایشات مورد استفاده قرار گرفتند. شرایط نگهداری موشها به صورت سیکل شبانه روزی طبیعی بود و غذا و آب کافی در دسترس حیوانات قرار داشت. در هر قفس ۱۰ سر موش نگهداری می‌شد و دمای محیط ۲۵-۲۱ درجه سانتیگراد بود. برای هر گروه آزمایش ۶ سر موش ماده و یا ۶ سر موش نر مورد استفاده قرار گرفت (یک گروه کنترل و ۲۱ گروه آزمایش).

**داروهای مورد استفاده:** در این تحقیق از مورفین سولفات (تماد - ایران) استفاده گردید، بدین شکل که مورفین در آب آشامیدنی حیوانات حل می‌شد.

**روش کار:** در ۴۸ ساعت اول به ازای هر میلی لیتر آب آشامیدنی حیوانات ۰/۱ میلی گرم سولفات مورفین اضافه می‌شد. در ۴۸ ساعت دوم این مقدار به ۰/۲ میلی گرم افزایش می‌یافت و در ۴۸ ساعت سوم مقدار مورفین ۰/۳ و در ۴۸ ساعت چهارم مقدار مورفین ۰/۴ میلی گرم بود که این مقدار تا پایان روز ۲۱ ثابت باقی می‌ماند. در دو سری آزمایش دیگر مقدار ابتدایی مورفین به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی گرم به ازای هر میلی لیتر آب آشامیدنی بود. به دلیل اینکه مورفین دارای اثرات سمی و فارماکولوژیک سوئی است، در این تحقیق از سه دوز مختلف استفاده گردید که چنانچه پاسخ برای هر سه دوز یکسان به نظر برسد نتیجه را می‌توان به اثرات سمی مورفین ارتباط داد، در غیر این صورت اثرات دیده شده مربوط به خواص فارماکولوژیک مورفین خواهد بود.

**روش تعیین اعتیاد در موشها:** بدین منظور از تجویز داخل صفاقی فالوکسان با دوز ۲mg/kg استفاده شد و

1-Rat  
2-Cryptorchidism

## جدول ۱- معرفی گروههای آزمایشی موشهای Balb/c دریافت‌کننده مورفین خوراکی

نر	ماده
سالم	معتاد قبل بارداری
معتاد	معتاد قبل بارداری
سالم	معتاد قبل و طی بارداری
معتاد	معتاد قبل و طی بارداری
سالم	معتاد طی بارداری
معتاد	معتاد طی بارداری
سالم	سالم
سالم	سالم (کنترل)

مشاهده در پوش واژنی) معتاد گردید و گروهی که در آنها موشهای ماده قبل و حین بارداری معتاد بود. بدین ترتیب برای هر دوز مورفین ۸ گروه آزمایشی وجود داشت.

ابزار آماری: برای مقایسه نتایج گروه کنترل با گروههای آزمایشی از آزمون نسبت odds استفاده شد و نتایج با  $P < 0.05$  معنی‌دار لحاظ گردید. به منظور تعیین اختلاف بین گروهها از آزمون آنالیز واریانس استفاده شد. به این ترتیب که گروه تیمار مورد محاسبه قرار گرفت.

## نتایج

آزمایشات نشان داد که تعداد جنین‌های موشهای ماده گروه کنترل ۱۰/۵ سر به ازای هر موش می‌باشد این تعداد به عنوان کنترل برای محاسبه شانس تولد در گروههای آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج حاصل در دوزهای مختلف عبارتند از:

۱- نتایج بررسی تعداد جنین‌ها در گروهی که مورفین را به میزان  $0.1 \text{ mg/ml}$  دریافت کردند نشان می‌دهد که به جز گروه دوم، در بقیه گروهها شانس بارداری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. در گروه ششم که موشهای ماده بعد از بارداری معتاد شده بودند

علائم ترک مصرف دارو مانند پرش و بخصوص اسهال پس از گذشت ۳۰ دقیقه از زمان تزریق مشاهده شد. موشهایی که این علائم را از خود نشان نمی‌دادند از دور آزمایش حذف شدند.

جراحی: پس از مشاهده در پوش واژنی و تعیین روز صفر بارداری، موشهای نر از موشهای ماده جدا شده و پس از گذشت ۱۷ روز از شروع بارداری موشهای ماده با اتر بیهوش و سپس رحم و جنین‌های آنها خارج شد. تعداد جنین‌ها، شمارش و تعداد پلاکهای جفتی نیز به عنوان جنین‌هایی که نتوانسته‌اند دوره تکامل را طی کنند مورد شمارش قرار گرفت.

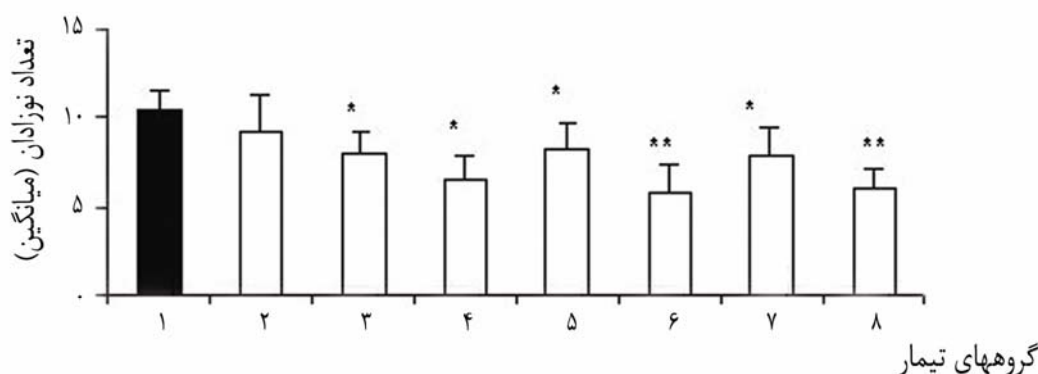
گروه‌بندی دارویی: حیوانات مورد استفاده این آزمایش در گروههای زیر تقسیم شدند (جدول ۱):

الف: گروه نر معتاد که خود دارای دو زیر گروه نر معتاد+ ماده سالم و نر معتاد+ماده معتاد بود.

ب: گروه نر سالم که خود دارای دو زیر گروه نر سالم+ ماده سالم و نر سالم+ماده معتاد بود.

ج: گروهی که نر و ماده هر دو سالم بودند به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

د: در گروههایی که ماده در آنها معتاد بود خود به سه زیر گروه تقسیم شدند. گروهی که در آنها ماده قبل از بارداری معتاد گردیده بود و در حین بارداری اعتیاد نداشت، گروهی که ماده در آنها بعد از بارداری (بعد از



نمودار ۱ - بررسی اثر مورفین خوراکی با دوز اولیه  $0.1mg/ml$  بر میزان بارداری موش های سوری

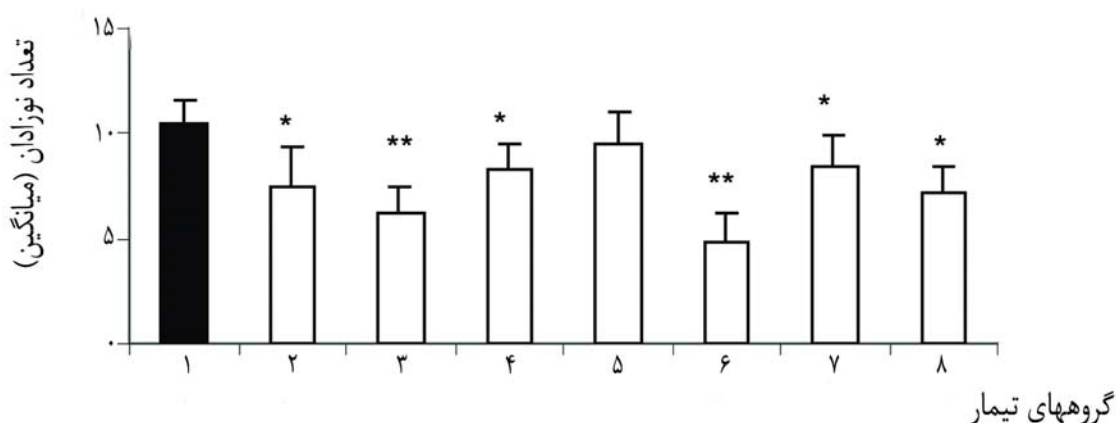
گروههای آزمایش : ۱=کنترل ، ۲=ماده معتاد قبل وبعد از بارداری + نر معتاد ، ۳=ماده معتاد قبل وبعد از بارداری + نر سالم ، ۴=ماده معتاد قبل از بارداری + نر معتاد ، ۵=ماده معتاد قبل از بارداری + نر سالم ، ۶=ماده معتاد بعد از بارداری + نر معتاد ، ۷=ماده معتاد بعد از بارداری + نر سالم ، ۸=ماده سالم + نر معتاد  
\* $p<0.05$  , \*\* $p<0.01$

شده بودند بیشترین کاهش تعداد جنین ها را نشان می دهد و این مسئله بیان کننده اثر مورفین در کاهش میزان بارداری موشهای سوری است. این کاهش حتی در گروههایی که فقط موش نر معتاد بوده است نیز دیده می شود (نمودار ۲).

۳- نتایج بررسی تعداد جنین ها در گروهی که مورفین را به میزان  $0.1mg/ml$  دریافت کردند نشان می دهد که به جز گروه دوم، در بقیه گروهها شانس بارداری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. در گروه ششم که

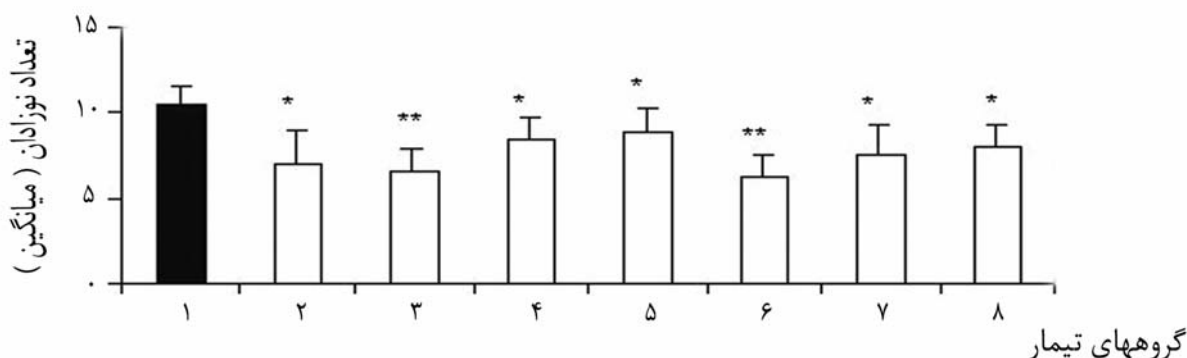
بیشترین کاهش را نشان می دهد و این مسئله بیان کننده اثر مورفین در کاهش میزان بارداری موشهای سوری است. این کاهش حتی در گروههایی که فقط موش نر معتاد بوده است نیز مشاهده می شود (نمودار ۱).

۲- نتایج بررسی تعداد جنین ها در گروهی که مورفین را به میزان  $0.05mg/ml$  دریافت کردند نشان می دهد که به جز گروه دوم، در بقیه گروهها شانس بارداری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. در گروه ششم که موشهای ماده بعد از بارداری معتاد



نمودار ۲ - بررسی اثر مورفین خوراکی با دوز اولیه  $0.05mg/ml$  بر میزان بارداری موش های سوری

گروههای آزمایش : ۱=کنترل ، ۲=ماده معتاد قبل وبعد از بارداری + نر معتاد ، ۳=ماده معتاد قبل وبعد از بارداری + نر سالم ، ۴=ماده معتاد قبل از بارداری + نر معتاد ، ۵=ماده معتاد قبل از بارداری + نر سالم ، ۶=ماده معتاد بعد از بارداری + نر معتاد ، ۷=ماده معتاد بعد از بارداری + نر سالم ، ۸=ماده سالم + نر معتاد  
\* $p<0.05$  , \*\* $p<0.01$



### نمودار ۳ - بررسی اثر مورفین خوراکی با دوز اولیه ۱mg/ml بر میزان بارداری موشهای سوری

گروههای آزمایش : ۱=کنترل ، ۲=ماده معتاد قبل و بعد از بارداری + نر معتاد ، ۳=ماده معتاد قبل و بعد از بارداری + نر سالم ، ۴=ماده معتاد قبل از بارداری + نر معتاد ، ۵=ماده معتاد قبل از بارداری + نر سالم ، ۶=ماده معتاد بعد از بارداری + نر معتاد ، ۷=ماده معتاد بعد از بارداری + نر سالم ، ۸=ماده سالم + نر معتاد  
\* $p < 0.05$  ، \*\* $p < 0.01$

سیکل جنسی آنها شود و این امر را به اثر مورفین در تغییر میزان نوراپی نفرین هیپوتالاموس و کاهش سطح پلاسمایی هورمون لوتینی (LH) نسبت داده اند (۲). این احتمال وجود دارد که در این مطالعه نیز یک مکانیسم مشابه سبب کاهش میزان بارداری موشهای ماده معتاد شده باشد. در تحقیقات قبلی به این نکته مهم اشاره شده است که تجویز مورفین می تواند باعث کاهش وزن و اندازه تخمدان و در نتیجه کاهش عملکرد آن شود (۷). بنابراین ممکن است که مورفین با اثر مستقیم بر تخمدانها و کاهش کارایی آنها باعث کاهش قدرت تولیدمثل در موشهای ماده معتاد گردد.

از سوی دیگر در گروهی که موشهای ماده سالم با موشهای نر معتاد جفت شده بودند نیز کاهش میزان بارداری دیده شد. این نتیجه نیز با نتایج سایر محققان همخوانی دارد (۸). در تحقیقات مذکور نشان داده شده است که تجویز مورفین به موشهای نر سبب کاهش سطح سرمی LH و تستوسترون و همچنین کاهش وزن بیضه ها در موشهای نر شده است. این احتمال وجود دارد که در این مطالعه نیز کاهش سطح LH و تستوسترون پلازما سبب کاهش تولید اسپرم و در

موشهای ماده بعد از بارداری معتاد شده بودند بیشترین کاهش را نشان می دهد که این مسئله بیان کننده اثر مورفین در کاهش میزان بارداری موشهای سوری است. این کاهش حتی در گروههایی که فقط موش نر معتاد بوده است نیز دیده می شود (نمودار ۳). نتایج آزمون آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی داری بین گروهها وجود دارد. این اختلاف بین گروههای ماده معتاد پس از بارداری جفت شده با نر معتاد با سایر گروهها در درون دسته تیمار و نیز دسته تیمار ۰/۰۵ با دو دسته تیمار دیگر بود ( $P < 0.001$ ).  
( $F(21/797)=14$ ).

### بحث

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه مصرف خوراکی مورفین می تواند سبب کاهش تعداد نوزادان گردد. این نتیجه در اکثر گروههای آزمایش بدست آمد که بیانگر تأثیر مورفین در کاهش بارداری در موشها است. برای اولین بار اثر مصرف خوراکی مورفین در موشهای نر مورد بررسی قرار گرفت که مدلسازی بهتری با موارد انسانی می باشد. آزمایشات قبلی نشان داده اند که تجویز مورفین به موشهای ماده می تواند سبب اختلال در

1-Luteinizing Hormone

نتیجه کاهش قدرت باروری شده باشد. از سوی دیگر گیرنده‌های اپیوئیدی در بافت بیضه شناسایی شده است و ممکن است که مورفین با اثر مستقیم بر بافت بیضه باعث مهار اسپرماتوژنز در این اندام گردد (۸). در مورد مکانیسم عمل مورفین عقیده بر این است که این دارو هر سه نوع گیرنده اصلی اپیوئیدی یعنی گیرنده‌های مو، دلتا و کاپا را تحریک می‌کند. تحریک این گیرنده‌ها به کاهش ورود یون کلسیم به سلول، افزایش خروج یون پتاسیم از سلول و کاهش تولید آدنوزین منوفسفات حلقوی (cAMP) در داخل سلول را باعث می‌شود (۱۰). در هنگام استفاده طولانی مدت از مورفین مکانیسمهای جبرانی بکار افتاده و اثر مورفین در کاهش cAMP را جبران می‌کند. در این حالت بیان ژن آنزیم آدنیلات سیکلاز در سلول افزایش یافته و تولید (cAMP) نیز افزایش می‌یابد (۹). بر اساس مطالعات انجام شده این امر می‌تواند به کاهش سطح پروستاگلاندین E در ناحیه هیپوتالاموس منجر شود. این ماده عامل اصلی در تحریک تولید و رهاسدن نوراپی نفرین در هیپوتالاموس است (۷). رهاسدن نوراپی نفرین عامل مهم فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد می‌باشد (۷). این یافته‌ها بیان می‌کنند که مورفین مهمترین عامل تحریک تولید سلولهای جنسی را در مغز مهار کرده و در نتیجه بر قدرت باروری موشها مؤثر می‌باشد. از سوی دیگر در آزمایشات ما مشخص شد که بیشترین اثر مورفین در دوز ۰/۰۵ mg/ml، می‌باشد. این نتیجه بیان کننده وابسته به دوز بودن اثرات مورفین است و معنای دیگر آن این است که مورفین اثرات فارماکولوژیک داشته و اثرات توکسیکولوژیک از مورفین در این آزمایش مشاهده نشده است (۱۰). در نهایت اینکه آزمایشات حاضر نشان‌دهنده اثر شدید مورفین در کاهش شناس بارداری در موش‌ها است. در هر صورت بایستی که اثرات سوء مصرف مواد مخدر در انسان را نیز مدنظر

I-cyclic Adenosine Monophosphate

داشت. درباره اینکه مورفین چگونه سبب کاهش شناس بقاء و تولد جنین می‌شود در مورد هر دو جنس نر و ماده چند احتمال وجود دارد. در مورد جنس ماده نشان داده شده است که تجویز مورفین باعث بی‌نظمی در سیکل تخمدانی نیز می‌شود (۲). همچنین تیمار با مورفین ممکن است با مهار آزادشدن هورمون لوتینی بر شکل‌گیری جسم زرد و تکوین فولیکولها مؤثر باشد (۵، ۲). همچنین مورفین با کاهش وزن تخمدان بر فعالیت استروژن‌سازی آن اثر کرده و سیکل نامنظم تخمدانی را باعث می‌شود، که تمامی این عوارض در جهت کاهش و اختلال در تولید تخمک‌ها و در نتیجه کاهش باروری می‌باشد. بروز سیکل قاعدگی نامنظم در انسان نیز توسط مورفین گزارش شده است (۱۱). این مسئله می‌تواند توجیهی برای کاهش تعداد جنین‌ها در موشهای ماده معتاد در این مطالعه باشد (۱۲). از سوی دیگر در جنس نر نیز مورفین سبب بروز ناهنجاریهای زیادی در سیستم تولیدمثل می‌گردد که این مسئله می‌تواند به کاهش باروری در جنس نر منجر شود. بعنوان مثال مشخص شده است تیمار با مورفین سبب کاهش فعالیت سیستم زایشی موشهای نر می‌شود (۷، ۳) همچنین انجام مطالعاتی بر روی مردان معتاد، دارای اختلالات زیادی در عملکرد جنسی خود می‌باشند (۱۳). نتایج مطالعات ما نیز نشان می‌دهد که موشهای نر معتاد هنگامی که با ماده‌های سالم جفت می‌شود توانایی باروری کمی را از خود نشان می‌دهند و این یافته با یافته‌های قبلی همخوانی زیادی دارد. بطور کلی بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که مصرف مورفین در هر دو جنس می‌تواند به بروز مشکلات زیادی در تولیدمثل در موشهای سوری نژاد balb/c منجر شود این نتایج می‌تواند در مورد هر دو جنس انسان نیز قابل تعمیم باشد و نشان‌دهنده خطر مورفین بعنوان یک سم در کاهش توانایی تولیدمثل در انسان باشد.

پزشکی بقیه‌الله (عج) که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم

## References

- 1-Koop G. F., Le Moal M. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacol.* 2001; 24(2): 97- 129.
- 2-Siddiqui A., Haq S., Shah B.H. Prenatal exposure to morphine disrupts brain norepinephrine, ovarian cyclicity and sexual reactivity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997; 58(1): 243- 8.
- 3-Akabori A., Barralough C.A., Effects of morphine on luteinizing hormone secretion and catecholamine turnover in the hypothalamus of estrogen treated rats. *Brain Res.* 1986; 36(2): 221-6.
- 4-Zagon I.S., Mclaughlin P.J. Morphine and brain growth retardation in the rat. *Pharmacol.* 1977; 15(3): 276- 82.
- 5-Zagon I.S., Mclaughlin P.J. Effect of chronic morphine administration on pregnant rats and their offspring. *Pharmacol.* 1977; 15(4): 302-10.
- 6-Badaway A.A., Evans M. Rapid reversal by naloxone of the chronic effects of morphine on liver and tryptophan brain metabolism. *Br J Pharmacol.* 1981; 74(3): 511- 3.
- 7-Lal P., Rajeshwari-Devi R. K. Effect of chronic naloxone and morphine treatments on testicular, body weight and plumage pigmentation cycle. *Lal Munia. Estrilba Amandava, Gen Comp End.* 1997; 107: 2- 11.
- 8-Yilmaz B., Konar V. Influence of chronic morphine exposure on serum LH, FSH, testosterone levels and body and testicular weights in the developing male rats. *Archives of Andrology.* 1999; 43: 189- 96.
- 9-Williams J.T., Christie M.J., Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev.* 2001; 81(1): 299- 343.
- 10-Ross E.M. In: Goodman Gilman A., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. *The pharmacological basis of therapeutics.* 8<sup>th</sup> Edition, Pergamon Press, New York. 1991; pp 33- 48.
- 11-Kalra S.P. Opioid adrenergic steroid connections in regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. 1984; 38(5): 418- 26.
- 12-Johnson J.H., Rosecrans J.A. Blockade of ovulation by methadone in the rat: a central nervous system mediated acute effect. *Pharmacol J Exp Ther.* 1980; 213(1): 110- 3.
- 13-Sheridan P.J., Buchanan J.M. The effects of opiate on androgen binding in the forebrain of the rat. *Int J Fertil.* 1980; 25(1): 36- 43.