

Klorheksidin diglukonatin insan periferel kan kültürlerinde antioksidan enzim seviyeleri üzerine etkilerinin incelenmesi

Analyzing of the effects of chlorhexidine digluconate on the antioxidant enzyme levels in human peripheral blood cultures

Taner Arabacı, DDS, PhD,^a Hasan Türkez, DDS, PhD,^b Yasin Çiçek, DDS, PhD,^a Fatime Geyiko lu, DDS, PhD,^c Abdulgani Tatar, DDS, PhD,^d M. Sait Kele , DDS, PhD,^e Arif aybak, DDS, PhD,^a Alper Kızılda , DDS, PhD,^a

^aAtatürk Üniversitesi, Di Hekimlik Fakültesi, Peridontoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.

^bAtatürk Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.

^cAtatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye.

^dAtatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye

^eAtatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Erzurum, Türkiye

Received: 13 November 2012

Accepted: 21 February 2013

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, klorheksidin diglukonatin (KHG) insan periferel kan kültürlerinde antioksidan enzim seviyeleri üzerine olan biyokimyasal etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Daha önce herhangi bir toksik ajana maruz kalmamış ve sistemik olarak sağlıklı 10 bireyden (5 erkek, 5 kadın) elde edilen kan örnekleri ile kan kültürleri hazırlandı. Elde edilen kültürler farklı konsantrasyonlarda KHG (0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 mmol/L) ile muamele edildi. Biyokimyasal etkilerin değerlendirilmesi amacıyla glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) enzim aktiviteleri incelendi.

Bulgular: KHG'nin 0.1, 0.2 ve 0.4 mmol/L'lık konsantrasyonları ile muamele edilen kan kültürlerinde GPx, SOD ve CAT enzim aktivitelerinde doza bağlı istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma izlendi ($p<0.05$).

Sonuç: Bu çalışmada, KHG'nin insan periferel kan kültürlerinde antioksidan enzim seviyeleri üzerindeki etkilerini araştıran ilk in vitro çalışmadır. Sonuç olarak, bu bileşimin kan hücrelerindeki antioksidan enzim aktivitelerini etkilemek suretiyle doza bağlı sitotoksik etkilere sahip olduğu da ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Klorheksidin, toksisite, antioksidan enzim.

ABSTRACT

Objectives: In the present study, it was aimed to investigate the biochemical effects of chlorhexidine digluconate (CHX) on the antioxidant enzyme levels in human peripheral blood cell cultures.

Materials and Methods: The blood cultures were prepared using the blood samples obtained from 10 individuals (5 male and 5 female) who were systemically healthy and were not exposed to any toxic agent before. The cultures were exposed to different concentrations of CHX (0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 mmol/L). Glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) enzyme activities were analyzed in order to evaluate the biochemical effects.

Results: A dose-dependent statistically significant reduction was seen in the GPx, SOD and CAT enzyme activities in the blood cultures treated with 0.1, 0.2 ve 0.4 mmol/L concentrations of CHX.

Conclusion: This is the first in vitro study investigating the effects of CHX on antioxidant enzyme levels in the human peripheral blood cultures. In conclusion, it was revealed that CHX had dose-dependent cytotoxic effects by influencing the antioxidant enzyme activities in blood cells.

Keywords: Chlorhexidine, toxicity, antioxidant enzyme.

Taner ARABACI
Atatürk Üniversitesi
Di Hekimlik Fakültesi
Periodontoloji AD
25240 Erzurum/TÜRK YE
Tel:
Fax: +90 442 236 09 45
E-mail: t-arabaci@hotmail.com

G R

Son yıllarda kimyasal plak kontrolü amacıyla yapılan oral hijyen uygulamaları çürük olumu ve periodontal hastalıklara karşı koruyucu müdahalede önemli bir yere sahip olmuştur. Di fırçalama ve di ipi kullanma gibi bireysel olarak gerçekleştirilen mekanik yöntemler, özellikle dişlerin ara yüz bölgelerinde yetersiz kaldığı için kimyasal ajanların kullanımına ilgi artmıştır.¹ Plak kontrolünde mekanik yöntemlerle birlikte antimikrobiyal solüsyonların kullanımının oldukça etkili olduğu belirlenmiş ve böylece ağız çalkalama solüsyonları giderek yaygın bir kullanım alanı bulmuştur.²

Klorheksidin diglukonat (KHG) heksametilen köprüsü içeren bisbiguanid yapısında bir ağız çalkalama solüsyonudur.³ KHG etkili bir antimikrobiyal ajan olup uzun yıllardır topikal antiseptik ajan olarak kullanılmaktadır.⁴ Geni spektrumlu bir ajan olan KHG'nin Gram (+) ve (-) bakterilere, mayalara ve virüslere karşı etkili olduğu rapor edilmiştir.⁵ S. Mutans ve P. Gingivalis sayısının azaltılmasında,⁶ diş çürüklerinin önlenmesinde,⁷ herpes ağız lezyonlarında,⁸ oral candida enfeksiyonlarında,⁹ baş boyun kanserleri ile ilgili kemoterapi ve radyoterapi alan bireylerde kullanılmaktadır.¹⁰ HIV ve hepatit B virüsüne karşı da etkili olduğu rapor edilmiştir.^{11,12}

KHG'nin antibakteriyel etkisi, bakterilerce emilimi ile ilgili olduğu belirtilmektedir. Nötral pH'da pozitif yüklü KHG molekülü negatif yüklü bakteriler tarafından absorbe edilirken asidik ortamlarda emilim azalır. Düşük

yo unluklarda sitoplazma zarının organizasyonunun bozulmasına sebep olur. Böylece bakteriyi ilaca karşı geçirgen kılar ve bakteri hücresinde önemli metabolik olayları inhibe eder. Yüksek yo unluklarda ise bakterilerin sitoplazma içeriklerini koagüle eder.^{13,14}

KHG en yaygın kullanılan ve test edilen ajan olduğundan, özellikle yüksek bakterisidal yeteneği, oral bakterilerin büyük bir kısmında matriks metalloproteinazları azaltması ve proteolitik, glikosidik aktiviteleri engelleme kabiliyetinden dolayı antiseptik tedavide altın standart olarak kabul edilmiştir.¹⁵ Ancak dişlerde, dilde ve restorasyonlarda kahverengi boyama ve tat duyusunun geçici kaybı gibi yan etkileri de söz konusudur.¹⁶ Dişler taraftan, tekrarlayan kullanımlarda deride birikerek kümülatif etkilere yol açtığı bilinen KHG'nin deney hayvanlarının çeşitli organlarında toksik etkilere neden olduğu bildirilmiştir.¹⁷ Bu bulgulara rağmen KHG'nin insanlarda toksik etkileri üzerine literatürde sınırlı sayıda çalışma yer almakta olup, bu çalışmaların sonuçları birbirleriyle çeliçmektedir.¹⁴ Kimyasal maddelerin hücre kültürleri üzerindeki toksik etkileri, hücrelerin genetik yapılarını ya da biyokimyasal faaliyetlerini bozacak şekilde meydana gelebilir. Toksik maddelerin hücrelerde biyokimyasal faaliyetleri sekteye uğratması sitotoksik etkileri olarak tanımlanmaktadır. Glutatyon peroksidaz (GPx), Süperoksit dismutaz (SOD) ve Katalaz (KAT) hücreleri serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif hasardan koruyan en önemli antioksidanlar olup, sitotoksikite çalışmalarında sıklıkla kullanılan enzimlerdir. Bu enzimlerden, GPx hidrojen peroksid, steroid ve lipid hidroperoksitler üzerine etkili bir antioksidan enzim olup, eritrosit ve lökosit gibi hücreleri oksidatif hasara karşı koruyucu görev alır.^{18,19} SOD süperoksit radikallerine karşı hücrenin enzimatik antioksidan savunmasında en

önemli rolü oynarken,²⁰ SOD'un antioksidan aktivitesi sonucu açığa çıkan hidrojen peroksitin detoksifiye edilmesi KAT veya GPx tarafından sağlanır.²¹ Bu çalışmada, *in vitro* ortamlarda insan periferik kan kültürlerinde KHG'nin yukarıda belirtilen antioksidan enzim seviyeleri üzerine olan biyokimyasal etkilerinin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kültürlerin hazırlanması ve KHG ile muamele edilmesi

Bu çalışmada, kan kültürlerinin elde edilmesi amacıyla meslekleri gereği daha önce herhangi bir fiziksel ve kimyasal toksik ajana maruz kalmamış, sigara ve alkol kullanmayan 27-31 yaş arası sistemik olarak sağlıklı 10 bireyden (5 erkek, 5 kadın) alınan kan örnekleri kullanıldı. Heparinize enjektöre alınan kan numuneleri, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Toksikoloji ve Doku Kültürü Laboratuvarlarında yürütülen biyokimyasal ve genetik araştırmalarda kullanıldı. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinde etik kurul onayı alındıktan sonra kan kültürleri daha önce Evans & O'Riordan²² tarafından tanımlanan protokole uygun olarak elde edildi. Periferik kan hücre kültürü eldesi için steril kültür tüpleri içerisine önceden hazırlanmış ve 37 °C'ye getirilmiş besiyerinden (Chromosome Medium B, Biochrom®, Almanya) 5 ml konuldu ve besiyerleri üzerine 0.5 ml tam kan eklendi. Elde edilen kültürler farklı konsantrasyonlarda KHG (0,05, 0,1, 0,2 ve 0,4 mmol/L) ile muamele edildi. Pozitif kontrol grubu elde etmek amacıyla Mitomisin C (10^{-7} M) kullanılırken, herhangi bir ajanla muamele edilmeyen kültür tüpleri negatif kontrol olarak kullanıldı.

Antioksidan Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi

Biyokimyasal etkilerin de erlendirilmesinde süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim

aktiviteleri ele alındı. SOD, KAT ve GPx enzim aktivitelerinin tayininde sırasıyla, Misra ve Fridovich,²³ Aebi²⁴ ve Carlberg ve Mannervik²⁵ tarafından uygulanan spektrofotometrik yöntemler esas alındı.

statistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel yönden de erlendirilmesinde S.P.S.S 11.5 programı kullanıldı. SOD, KAT ve GPx enzim aktivitelerinin kontrol ve muamele grupları arasında de i iklik gösterip göstermedi i varyans analizi kullanılarak tespit edildi. Varyans analizi için one way Anova testlerinden Fisher's Least Significant Difference (LSD) testleri kullanıldı. Elde edilen sonuçlar 0,05 anlam seviyeleri göz önünde bulundurularak yorumlandı.

BULGULAR

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, 0,05, 0,1, 0,2 ve 0,4 mmol/L KHG ile muamele edilen kültürlerde 0,05 ve 0,1 mmol/L konsantrasyonda her üç enzim seviyesinde de anlamlı bir farklılık izlenmedi ($p>0,05$). 0,2 mmol/L KHG konsantrasyonu ile muamele edilen kültürlerde GPx ve SOD enzim seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma izlenirken ($p<0,05$), bu konsantrasyonda KAT enzim seviyesinde istatistiksel anlamlı bir de i iklik izlenmedi ($p>0,05$). 0,4 mmol/L konsantrasyonda KHG ile muamele edilen kan kültürlerindeki antioksidan enzim seviyelerinin incelenmesinde ise artan doza ba lı olarak her üç enzim seviyesinin de istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 1).

TARTI MA

Topikal antiseptik ajanlar, oral ve periodontal sa lı ın sürdürülmesi amacıyla uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. KHG, yaygın olarak kullanılan ve en etkili antiseptik ajan olmakla beraber, toksik etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, günümüzde tüm veya kısmi a ız dezenfeksiyon tekni i gibi

uygulamalarda KHG derin periodontal ceplerin subgingival periodontal mekanik tedavi ile tedavisinde irrigasyon amacıyla oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.^{26,27} Bu gibi uygulamalarda KHG'nin di eti olu undan konnektif dokuya do ru

penetre olmak üzere absorbe olabilece i ve etkiledi i hücrelerde potansiyel toksik etkilere sebep olabilece i dü ünülmektedir.

Daha önce KHG'nin oral kullanımında emiliminin çok dü ük olmasından dolayı önemli bir boyutta toksik etki

Tablo 1. n vitro KHG muamelesi sonrasında kültürlerde tespit edilen GPx, SOD ve KAT enzim aktivite düzeyleri.

Gruplar	GPx aktivitesi (U/ml)	SOD aktivitesi (U/ml)	KAT aktivitesi (U/g Hb)
Kontrol (-)	83.7 ± 11.5	89.5 ± 7.5	260.5 ± 28.6
Kontrol (+) MMC	49.5 ± 9.8*	74.1 ± 6.8*	231.2 ± 24.5*
0.05 mmol/L KHG	80.1 ± 11.5	91.2 ± 8.0	259.0 ± 28.4
0.1 mmol/L KHG	78.9 ± 11.2	89.3 ± 7.1	258.4 ± 27.3
0.2 mmol/L KHG	74.2 ± 10.5*	82.7 ± 5.9*	256.6 ± 25.1
0.4 mmol/L KHG	69.6 ± 8.3*	80.4 ± 6.6*	252.5 ± 29.3*

*statistiksel olarak 0.05 seviyesinde anlamlılı ı ifade etmektedir. MMC: Mitomisin C; KHG: Klorheksidin

olu turmadı ı belirtilmesine ra men,²⁸ bazı ara tırmacılar kullanılan klinik konsantrasyonlarda KHG'nin oral dokularda ve hücreler üzerinde sitotoksik etkilere neden oldu unu vurgulamı lardır.²⁹⁻³² KHG üzerine yapılan çalı malarda bu molekülün özellikle alveoler kemik hücre kültürleri ile epitel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller ve kırmızı kan hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere neden oldu u bildirilmi tir.^{29,33} Yine KHG ile muamele edilen osteoblastik, fibroblastik ve endotel hücre kültürlerinde artan konsantrasyonlarda KHG'nin kültürdeki hücrelerin canlılık oranını azalttı ı rapor edilmi tir.³⁰ Bu çalı maların varlı ına ra men, daha önce KHG'nin hücre kültürlerinde antioksidan enzim seviyeleri üzerine etkilerini ara tıran herhangi bir çalı ma bulunmamaktadır. Bu çalı mada, KHG'nin sitotoksik etkilerini de erlendirmek amacıyla insan periferik kan kültürlerinde SOD, GPx ve KAT gibi osteoblastik, fibroblastik ve endotel hücre

kültürlerinde artan konsantrasyonlarda KHG'nin kültürdeki hücrelerin canlılık oranını azalttı ı rapor edilmi tir.³⁰ Bu çalı maların varlı ına ra men, daha önce KHG'nin hücre kültürlerinde antioksidan enzim seviyeleri üzerine etkilerini ara tıran herhangi bir çalı ma bulunmamaktadır. Bu çalı mada, KHG'nin sitotoksik etkilerini de erlendirmek amacıyla insan periferik kan kültürlerinde SOD, GPx ve KAT gibi antioksidan kapasitesi olan enzim seviyeleri üzerine olan etkileri incelendi ve bu bile i in artan konsantrasyonlarının kültürlerde antioksidan enzim aktivitelerini olumsuz etkilemek suretiyle hücrelerde sitotoksik etkilere yol açtı ı bulundu. Bu çalı ma bu yönüyle de literatüre katkı sa layacak ilk çalı ma olacaktır.

Sonuç olarak KHG halen günümüzde en etkili a ız çalkalama solüsyonu olarak kullanılmaktadır. Özellikle antibakteriyel etkisinden dolayı gerek plak önleyici ajan olarak günlük kullanımda veya çe itli periodontal tedavilerden sonra gerekse

periodontal tedaviler esnasında irrigasyon amacıyla oldukça geni bir endikasyon yelpazesinde önerilmektedir. Bu nedenle oral olarak kullanımında yol açabileceği sitotoksik ve genotoksik etkilerinden dolayı daha detaylı çalımlarla güvenilirliği kanıtlanıncaya kadar uzun süreli kullanımlardan kaçınılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Drisko CH. Nonsurgical periodontology therapy. *Periodontol* 2000 2001;25:77-88.
2. Ciancio SG. Site specific delivery of antimicrobial agents for periodontal disease. *Gen Dent* 1999;47:172-178.
3. Eren K, Özmeriç N, Sardas S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. *Clin Oral Invest* 2001;6:150-154.
4. Hatipo lu H, Güncü GN, engün D. Klorheksidin içeren a ız gargarasının hatalı kullanımı sonucu gözlenen deskuamatif lezyonlar: Olgu Raporu. *Hacettepe Di hek Fak Derg* 2007;31:42-45.
5. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorheksidine J *Endod* 1997;23:229-231
6. George AM, Kalangi SK, Vasudevan M, Krishnaswamy NR. Chlorhexidine varnishes effectively inhibit *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans* — an in vivo study. *J Indian Soc Periodontol* 2010;14:178-180.
7. Autio- Gold J. The Role of Chlorhexidine in Caries Prevention. *Oper Dent* 2008;33:710-716.
8. Park JB, Park NH. Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;67:149-153.
9. Semprebom AM, Isidoro ACA, Machado MAN, Campelo PMS, Hofling JF, Samaranayake LP, Rosa EAR. Enhanced susceptibility of *Candida albicans* to chlorhexidine under anoxia. *Braz J Oral Sci* 2009;8:105-110.
10. Ferretti GA, Raybould TP, Brown AT, Macdonald JS, Greenwood M, Maruyama Y, Geil J, Lillich TT, Ash RC. Chlorhexidine prophylaxis for chemotherapy- and radiotherapy-induced stomatitis: a randomized double-blind trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;69:331-338.
11. Harbison MA, Hammer SM. Inactivation of human immunodeficiency virus by Betadine products and chlorhexidine. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1989;2:16-20.
12. Bernstein D, Schiff G, Echler G, Prince A, Feller M, Briner W. In vitro virucidal effectiveness of a 0.12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse. *J Dent Res* 1990;69:874-876.
13. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977;85:255-265.
14. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999;25:167-171.
15. Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol* 2012;61:399-419.
16. Menderes G, Athar Ali N, Aagaard K, Sangi-Haghpeykar H. Chlorhexidine-alcohol compared with povidone-iodine for surgical-site antisepsis in cesarean deliveries. *Obstet Gynecol* 2012;120:1037-1044.
17. Bartzokas CA, Corkill JE, Makin T. Evaluation of the skin disinfecting activity and cumulative effect of chlorhexidine and triclosan handwash preparations on hands artificially contaminated with *Serratia marcescens*. *Infect Control* 1987;8:163-167.

18. Onat T, Emerk K, Sözmen ET. İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık, 2002, Ankara.
19. Yıldırım A. İmmünite ve Adrenalektomili Sıçanların Eritrosit ve Mide Dokularında Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2003, Erzurum.
20. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular response to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 1025-1033.
21. Eken A. Hiperbarik oksijen tedavisi, oksidatif stres ve genetik toksisite arasındaki ilişkinin araştırılması. Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans tezi, 2003, Ankara.
22. Evans HJ, O'Riordan ML. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutat Res* 1975;31: 135-148.
23. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-3175.
24. Aebi H. Albrechtsso Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-126.
25. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 1972;250:5475-5480.
26. Quirynen M, Bollen CML, Vandekerckhove BN, Dekeyser C, Papaioannou W, Eyssen H. Full-vs. partial mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. *J Dent Res* 1995;67:1456-1467.
27. Reynold MA, Lavigne CK, Minah GE, Suzuki JB. Clinical effects of simultaneous ultrasonic scaling and subgingival irrigation with chlorhexidine. *J Clin Periodontol* 1992;19:595-600.
28. Xue Y, Zhang S, Yang Y, Lu M, Wang Y, Zhang T, Tang M, Takeshita H. Acute pulmonary toxic effects of chlorhexidine (CHX) following an intratracheal instillation in rats. *Hum Exp Toxicol* 2011;30:1795-1803.
29. Cabral MC, Costa MA, Fernandes MH. In vitro models of periodontal cells: a comparative study of long-term gingival, periodontal ligament and alveolar bone cell cultures in the presence of beta-glycerophosphate and dexamethasone. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:1079-1088.
30. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro* 2008;22:308-317.
31. Ribeiro DA, Bazo AP, da Silva Franchi CA, Marques MEA, Salvadori DMF. Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. *J Periodont Res* 2004;39:358-361.
32. Oosterwaal PHM, Mikx FHM, van den Brink ME, Renggli HH. Bactericidal concentration of chlorhexidine-digluconate, aminefluoride gel and stannous fluoride gel for subgingival bacteria tested in serum at short contact times. *J Periodont Res* 1989;24:155-160.
33. Babich H, Wurzbürger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L. An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biol Toxicol* 1995;11:79-88.