양파(*Allium cepa*) 추출물의 간보호 및 항산화 효과

임태진*, 임상철
상지대학교 생명자원과학대학 환경바이오시스템학부

The Hepatotprotective and Antioxidative Effects of Onion (*Allium* cepa) Extracts in Rat Hepatocyte Primary Culture

Tae-Jin Rhim and Sang-Cheol Lim
Division of Environment and Biosystem, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea

ABSTRACT

The objectives of present study were to investigate the hepatoprotective and antioxidative effects of onion extracts. Primary cultures of rat hepatocytes were incubated with 1.5 mM tert-butyl hydroperoxide(t-BHP), potent oxidizing agent for liver injury for 1 hr in the presence or absence of various concentrations (0, 0.01, 0.05, 0.1 or 0.3 mg/ml) of onion extract. Cytotoxicity and cell viability were determined by measuring glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) activity, lactate dehydrogenase(LDH) activity and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) value. Lipid peroxidation was evaluated using thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) assay. Effects on antioxidant system were determined by measuring catalase, glutathione peroxidase(GSH-Px), glutathione reductase(GSH-Rd) activities as well as DNA strand breaking assay. Incubation with t-BHP alone increased GOT and LDH acitivities and TBARS concentration but decreased MTT reduction. Onion extracts at the concentration of 0.05 mg/ml began to decrease GOT and LDH activities induced by 1.5 mM t-BHP. Decreased MTT reduction began to be increased by onion extract at the concentration of 0.01 mg/ml. Onion extracts at the concentration of 0.01 mg/ml began to decrease TBARS concentration induced by t-BHP. Taken together, onion extracts prevented t-BHP-induced hepatocyte injury and lipid peroxidation. Catalase, GSH-Px and GSH-Rd activities of hepatocytes were significantly decreased by 1.5 mM t-BHP for 1 hr incubation. Onion extracts, on the other hand, at the concentration of 0.1 mg/ml began to prevent t-BHP-induced decrease in catalase, GSH-Px and GSH-Rd activities. Onion extracts prevented hydroxyl radical-induced single-strand breakage in dose-dependent manner when plasmid DNA was incubated with various concentrations of onion extracts

in the presence of Fenton reagents producing hydroxyl radical. These results demonstrate that onion extracts suppressed t-BHP-induced cytoctoxicity, decreased viability and lipid peroxidation and increased GSH-Px, GSH-Rd and catalase activities. Thus hepatoprotective and antioxidant effects of onion extract seem to be due to, at least in part, the increase in antioxidant enzyme activities as well as prevention from hydroxyl radical-induced oxidation, followed by inhibition in lipid peroxidation.

Key words: onion extracts, cytotoxicity, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, DNA strand breaking, rat hepatocyte

서 론

과일과 채소 등에 포함되어 있는 비타민 C, 비타민 E, β-카로틴 및 폴리페놀 등과 같은 항산화물질들은 순환계 질병과 암 발생율을 감소시킨다고(Block 등, 1992; Diplock 등, 1998) 알려져 있다 . 플라보노이드는 폴리페놀의 일종으로써 다양한 구조를 가지며 식물계에 널리 분포하고 있다. *Allium* 과에 속하는 양파는 우리나라에서 식이 플라보노이드의 주된 공급원으로써, quercetin, kempherol 등의 플라보노이드가 풍부하며(Price 와 Rhodes, 1997; Chu 등, 2000; Nuutila 등, 2003) 특히, quercetin은 표피 바로아래에 가장 많이 분포한다고(Patil과 Pike, 1995) 알려져 있다. 양파 섭취와 암 발생간 역의 상관관계가(Dorant, 1996) 보고되었으며, 양파 섭취는 *atherosclerosis* 또는 *thrombotic disease*를 감소시켰다(Srivastava, 1986; Kendler, 1987). 또한 quercetin은 당뇨의 산화스트레스를 감소시켰고(Mahesh 와 Menon, 2004) 지질수준을 저하시켰다고(Bordia 등, 1975) 보고된 바 있다.

지금까지 양파의 독성 및 산화에 미치는 효과에 관한 수많은 연구들은 대부분 in vivo 실험에 의해 수행되었으나 간세포 in vitro 시스템을 이용한 양파 추출물의 간독성, 산화 및 항산화 방어에 대한 효과는 거의 보고된 바 없다. 최근에 단쇄 지질과산화물(short-chain lipid hydroperoxide)인 t-Butyl hydroperoxide(t-BHP)를 이용한 간세포 일차배양 시스템은 천연 추출물의 간손상, 지질과산화 억제, 항산화효 및 다양한 생물학적 효과들을 연구하는데 유용한 모델로 많이 사용되고 있다. 따라서, 양파추출물의 항산화 및 간보호 효과를 이해하기 위해서 본 연구에서는 간세포 일차배양을 통해 양파 추출물이 t-BHP에 의해 유발된 간세포 독성, 지질과산화 및 항산화효소 활성에 미치는 영향을 조사하였으며 DNA strand breaking 방법을 이용하여 양파추출물의 hydroxyl radical에 대한 항산화 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

시약 : Supercoilded plasmid pBR 322 DNA는 Roche사에서, Fetal bovine serum은 Cambrex사에서, HBSS, WME 및 L-glutamine은 GIBCO사에서 구입하였으며 기타 세포배양에 필요한 시약들과 생화학적 분석에 필요한 시약들은 Sigma Chemical사에서 구입하여 사용하였다.

양파 추출물 : 전라남도 무안군에서 생산되는 양파를 구입하여 시료로 사용하였다. 가장 바깥쪽의 주황색을 띤 표피를 제거, 음지에서 통풍건조후 세절하였다. 분쇄한 양파표피 15ng을 100 ml methanol(HPLC-grade)로 1시간 정도 교반한 뒤 20분간 ultrasonication시켰다. 상등액을 제거한 다음 methanol 추출을 2번 더 실시하였다. 상등액을 모두 수거하여 여과 후 evaporation시켜 최종적으로 0.8 g 가량 수거하였다. Methanol 양파추출물은 dimethyl sulfoxide에 녹여 실온에서 보관하였다.

실험동물 : (주)오리엔트로부터 구입한 6주령 Sprague-Dawley 수컷 랫드를 실험동물로 사용하였다. 본 실험실에서 사료와 물은 무제한 공급하였고 1주일의 적응기간을 거친 다음 간세포배양을 실시하였다.

Supercoiled DNA Strand Breaking Assay :

Hydroxyl radical에 의한 DNA strand breaking은 Hiramoto 등(1996)의 방법에 따라 측정하였다. Supercoiled pBR 322 DNA에 다양한 농도의 양파추출물을 넣고 H_2O_2(최종농도 0.099 mM) 와 $FeSO_4$(최종농도 0.099 mM)와 함께 37℃에서 1시간 배양한 후 1% agarose로 전기영동을 실시하였다. 각 DNA band의 density는 Scion Image program(Scion Image Beta 4.02 for windows)을 사용하여 측정하였다.

간세포배양 : 간세포 일차배양은 Seglen (1976)의 collagenase perfusion 방법을 기초로 하여 배양하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay :

간세포의 생존 및 증식은 MTT값에 의해 결정하였다. 배양액을 제거한 후 Mosmann (1983)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 처리군의 MTT값은 대조구를 100%로 기준하여 %MTT 감소로 표시하였다.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances(TBARS) assay :

지질과산화는 배양액의 TBARS 농도를 측정함으로써 결정하였다. 배양후 배양액을 채취하여 4^0C에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하였고, 상등액을 취하여 측정시까지 -20^0C에서 보관하였다. TBARS 농도는 Uchiyama와 Mihara(1978)의 방법을 수정한 Sunderman 등(1985)의 방법에 따라 처리군별 4반복하여 측정하였다. TBARS 농도는 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준용액으로 사용한 malondialdehyde 농도로 표기하였다.

효소 분석 : 배양후 배양액을 채취하여 4^0C에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하였고, 상등액을 취하여 측정시까지 -20^0C에서 보관하였다. Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 활성은 Reitman과 Frankel(1957)의 방법에 따라 측정하였다. Lactate dehydrogenase(LDH)

활성은 Vassault(1983)의 방법에 따라 측정하였다.

단백질 정량 : 단백질 함량은 BSA를 표준시약으로 사용하여 Bradford(1976)의 방법에 따라 측정하였다.

자료분석 및 통계처리 : 처리군별 %MTT 감소, TBARS 농도, 효소 활성 및 DNA band density들은 일원 분산분석을 사용하여 조사하였으며, 처리효과가 인정되는 경우 처리군별 평균값의 차이는 Student-Newman-Keuls' test를 사용하여 $p < 0.05$에서 유의성을 조사하였다.

결과 및 고찰

t-BHP는 간세포내 cytochrome P450에 의해 alkoxyl 및 peroxyl radical로 대사되며 (Masaki 등 1989b, Minotti, 1989; 1989; Davies, 1989) 이러한 free radical intermediates가 지질과산화를 개시함으로써(Hogberg 등, 1975; Masaki 등, 1989a) 세포 손상을 초래한다고 (Rush 등, 1985) 알려져 있다. 따라서, 본 실험에서는 간세포의 산화손상을 유도할 목적으로 t-BHP를 사용하여 양파의 간보호 효과를 연구하였다. 다양한 농도의 양파추출물이 t-BHP로 유발된 간세포 손상 및 지질과산화에 미치는 효과는 Table 1과 같았다.

Table 1. Effects of onion extracts on GOT and LDH activites, MTT reduction and TBARS concentration in primary cultures of rat hepatocytes exposed to 1.5 mM of t-BHP.

Groups	GOT	LDH	MTT	TBARS
Onion Extract (㎎/㎖)	(U/ℓ)	(nmol NADH consumed/min)	(% reduction)	(μM)
Control	5.6±1.22[a]	187.8±12.30[a]	100.0±1.33[a]	3.0±0.35[a]
0	41.5±1.73[b]	832.1±52.81[b]	4.7±0.34[b]	13.0±0.55[b]
0.01	46.5±5.67[b]	744.0±65.75[b]	6.8±1.31[b]	11.4±0.22[c]
0.05	30.1±2.53[c]	512.4±46.67[c]	17.2±1.82[b]	8.8±0.44[d]
0.1	17.0±1.12[d]	336.3±24.42[d]	79.7±7.08[c]	5.6±0.50[e]
0.3	8.6±0.68[a]	207.3±4.57[a]	90.7±6.15[a,c]	4.9±0.40[e]

Hepatocytes were cultured for 1 hr in the presence of 1.5 mM of t-BHP and various concentraions of onion extracts except in control group where hepatocytes were maintained in the absence of t-BHP and onion extracts. Values are presented as the means±SE derived from four determinations.

[a,b,c,d e]Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

다양한 농도의 양파추출물이 t-BHP에 의해 유발된 간세포의 catalase, GSH-Px 및 GSH-Rd 활성에 미치는 효과는 Table 2와 같다.

Table 2. Effects of onion extracts on catalase, GSH-Px and GSH-Rd activities in primary cultures of rat hepatocytes exposed to 1.5 mM of t-BHP.

Groups	Catalase	GSH-Px	GSH-Rd
Onion Extract (mg/ml)	(μmole H_2O_2 consumed /min/mg protein)	(nmol NADHP oxidized /min/mg protein)	(nmol NADHP oxidized /min/mg protein)
Control	109.7±17.03[a]	48.0±2.84[a]	325.3±17.82[a]
0	25.6±2.50[b]	17.6±1.18[b]	70.7±8.26[b]
0.01	34.5±6.23[b]	17.4±1.84[b]	84.0±15.30[b]
0.05	41.5±7.07[b]	21.3±1.66[b]	105.3±10.75[b]
0.1	74.9±8.94[a]	36.0±2.40[c]	237.3±27.93[c]
0.3	90.7±12.67[a]	37.1±4.38[c]	230.7±25.43[c]

Hepatocytes were cultured for 1 hr in the presence of 1.5 mM of t-BHP and various concentraions of onion extracts except in control group where hepatocytes were maintained in the absence of t-BHP and onion extracts. Values are presented as the means±SE derived from four determinations.

[a,b,c,d]Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

DNA 전기영동을 이용하여 양파추출물 농도별 hydroxyl radical에 의해 유도된 DNA strand breaking에 미치는 효과는 Fig. 1과 Table 3에 나타내었다.

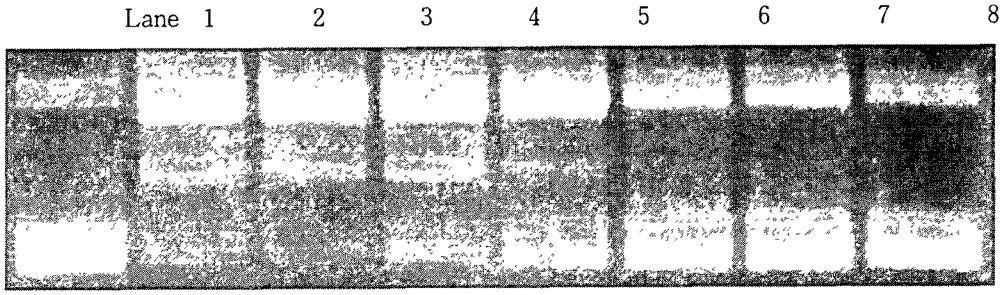

Figure 1. Electrophoresis of supercoiled plasmid DNA treated with hydroxyl radical in the presence of various concentrations of onion extracts.

Supercoiled pBR 322 DNA was incubated with 0.1 mM H_2O_2 and 0.1 mM $FeSO_4$ in the presence of onion extracts at 37℃ for 1 hr. Lane 1, no H_2O_2, $FeSO_4$ and onion extract addition; lane 2, H_2O_2 and $FeSO_4$ alone, no onion extract addition; lane 3, 0.0001 mg/ml onion extract; lane 4, 0.001 mg/ml onion extract; lane 5, 0.01 mg/ml onion extract; lane

6, 0.1 mg/ml onion extract; lane 7, 1 mg/ml onion extract; lane 8, 5 mg/ml onion extract.

Table 3. Effects of onion extracts on the protection of supercoiled plasmid DNA against DNA single-strand breakage induced by hydroxyl radical.

Groups	Density (Arbitrary Unit)	
Onion Extracts (mg/ml)	Top Band	Bottom Band
Control	325±9.3[a]	1148±41.5[a]
0	971±357[b]	31.8±2.7[b]
0.0001	952±267[b]	38±3.5[b]
0.001	946±11.6[b]	71±4.4[b]
0.01	794±23.9[c]	513±20.5[c]
0.1	572±7.6[d]	900±11.5[d]
1	502±5.7[e]	1002±25.4[e]
5	386±10.5[a]	1106±26.1[a]

Supercoiled pBR 322 DNA (10 ug/ml) were incubated at 37°C for 1 h in the presence of 0.1 mM H_2O_2, 0.1 mM $FeSO_4$ and various concentrations of onion extracts except in control group where pBR 322 DNA were maintained without 0.1 mM H_2O_2, 0.1 mM $FeSO_4$ and onion extract. The supercoiled and open circular forms of plasmid DNA were separated on a 1% agarose gel. Values from densitometry analysis of each band are presented as the means±SE derived from four determinations.

[a,b,c,d]Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

이상과 같이 간세포 일차배양에서 양파추출물은 t-BHP에 의해 유도된 간독성, 간세포 생존율 감소, 지질과산화를 억제시켰다. 양파추출물의 항산화 및 간보호 효과는 항산화 효소, 특히 catalase의 활성 증가 및 hydroxyl radical에 의해 유도된 산화억제에 기인하는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구의 목적은 양파추출물의 간보호 및 항산화 효과를 조사하기 위함이다. 간 손상을 유발시키는 t-BHP (1.5 mM) 존재하에 간세포를 0, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.3 mg/ml의 다양한 농도의 양파추출물로 1시간 동안 일차배양하였다. 간세포 독성과 생존율은 배양액의 GOT와 LDH 활성 및 MTT 값으로 결정하였고, 지질과산화는 TBARS 농도로 측정하였다. 항산화에 미치는 효과는 catalase, GSH-Px, GSH-Rd 활성 및 DNA strand breaking assay로 결

정하였다. t-BHP는 GOT와 LDH 활성 및 TBARS 농도를 증가시켰으며 MTT값은 감소시켰다. 0.05 mg/ml 이상 농도의 양파추출물 첨가는 1.5 mM 농도의 t-BHP에 의해 증가된 GOT 및 LDH 활성을 감소시켰으며 0.01 mg/ml 이상 농도의 양파추출물은 t-BHP에 의해 감소된 MTT 값을 증가시켰다. 또한 0.01 mg/ml 이상 농도의 양파추출물 첨가는 t-BHP에 의해 증가된 TBARS 농도를 감소시켜 양파추출물이 t-BHP에 의해 유발된 간손상과 지질과산화를 억제시켰다. 1시간 동안 1.5 mM 농도의 t-BHP 처리는 간세포의 catalase, GSH-Px 및 GSH-Rd 활성을 현저히 감소시켰다. 그러나 0.01 mg/ml 이상 농도의 양파추출물 첨가는 t-BHP에 의해 감소된 catalase, GSH-Px 및 GSH-Rd 활성을 증가시켰으며 특히 catalase 활성은 t-BHP 무첨가군 수준까지 증가시켰다. 또한 hydroxyl radical을 생성하는 Fenton 시약의 존재하에 plasmid DNA를 양파추출물과 함께 배양하였을 때양파추출물은 농도 의존적으로 hydroxyl radical에 의해 유도된 single-strand 절단을 억제하였다.

이상과 같이 간세포 일차배양에서 양파추출물은 t-BHP에 의해 유발된 간독성, 간세포 생존율 감소, 지질과산화를 농도 의존적으로 억제시켰고 또한 t-BHP에 의해 억제된 GSH-Px, GSH-Rd 및 catalase의 활성을 증가시켰다. 이와 같이 양파추출물의 간보호 및 항산화 효과는 항산화 효소, 특히 catalase의 활성 증가와 hydroxyl radical에 의해 유도된 산화억제 및 이에 따른 지질과산화 억제에 기인하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Aebi H. 1984. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105:121-126.
2. Block G, Patterson B, Subar A. 1992. Fruits, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. Nutr. Cancer. 18:1-29.
3. Bordia A, Bansal HC, Arora SK, Singh SV. 1975. Effect of the essential oils of garlic and onion on alimentary hyperlipemia. Atherosclerosis 21:15-19.
4. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
5. Carlberg I, Mannervik B. 1955. Glutathione reductase. Methods Enzymol. 113:484-490.
6. Chu Y-H, Chang C-L, Hsu H-F. 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. J. Sci. Food Agri. 80:561-566.
7. Davies MJ. 1989. Detection of peroxyl and alkoxyl radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. Biochem. J. 257:603-606.
8. Diplock AT, Charleux J-L, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J. 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. Brit. J. Nutr. 80S:S77-S112.
9. Dorant E, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Sturmans F. 1996. Consumption of

onions and a reduced risk of stomach carcinoma. Gastroenterology. 110:12-20.
10. Flohe L, Gunzler WA. 1984. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105:114-121.
11. Harris ED. 1992. Regulation of antioxidant enzymes. FASEB. J. 6:2675-2683.
12. Hiramoto K, Ojima N, Sako K-I, Kikugawa K. 1996. Effect of plant phenolics on the formation of the spin-adduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. Biol. Pharm. Bull. 19:558-563.
13. Hogberg J, Orreniun S, O'Brien PJ. 1975. Further studies on lipid-peroxide formation in isolated hepatocytes. Eur. J. Biochem. 59:449-455.
14. Hwang J-M, Wang C-J, Chou F-P, Tseng T-H, H냐도 Y-S, Lin W-L, Chu C-Y. 2002. Inhibitory effect of berberine on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in rat liver. Arch. Toxicol. 76:664-670.
15. Joyeux M, Rolland A, Fleurentin J, Mortier F, Dorfman P. 1990. Tert-butyl hydroperoxide-induced injury in isolate rat hepatocytes: a model for studying anti-hepatotoxic crude drugs. Planta Med. 56:171-174.
16. Kendler BS. 1987. Garlic (Allium sativum) and onion (Allium cepa): a review of their relationship to cardiovascular disease. Prev. Med. 16:670-685.
17. Mahesh T, Menon VP. 2004. Quercetin allievates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Phytother. Res. 18:123-127.
18. Masaki N, Kyle ME, Farber JL. 1989a. Tert-butyl hydroperoxide kills cultured hypatocytes by peroxidizing membrane lipids. Arch. Biochem. Biophys. 269:390-399.
19. Masaki N, Kyle ME, Serroni A, Farber JL. 1989b. Mitochondrial damage as a mechanism of cell injury in the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. Arch. Biochem. Biophys. 270:672-680.
20. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, Free Rad. Biol. Med. 17:235-248.
21. Minotti G. 1989. Tert-butyl hydroperoxide-dependent microsomal release of iron and lipid peroxidation. I. Evidence for the reductive release of nonheme, nonferritin iron. Arch. Biochem. Biophys. 273:137-143.
22. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65:55-63.
23. Nuutila AM, Puupponen-Pimia R, Aarni M, Oksman-Caldentey K-M. 2003. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. Food Chem. 81:485-493.
24. Patil BS, Pike LM. 1995. Distribution of quercetin content in different rings of various

coloured onion (Allium cepa L.) cultivars. J. Hortic. Sci. 70:643-650.

25. Price KR, Rhodes MJC. 1997. Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (Allium cepa) and changes in composition resulting from autolysis. J. Sci. Food Agri. 74:331-339.
26. Rall TW, Lehninger AL. 1952. Glutathione reductase of animal tissues. J. Biol. Chem. 194:119-130.
27. Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. Am. J. Clin. Pathol. 28:56-63.
28. Rush GF, Gorski JR, Ripple MG, Sowinski J, Bugelski P, Hewitt WR. 1985. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 78:473-483.
29. Seglen PO. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol. 13:29-83.
30. Srivastava KC. 1986. Onion exerts antiaggregatory effects by altering arachidonic acid metabolism in platelets. Prostaglandines Leukot. Med. 24:43-50.
31. Steel RGD, Torre JH. 1980. Principles and Procedures of Statistics. 2nd ed, McGraw-Hill, New York, p.186-187.
32. Sunderman FW Jr, Marzouk A, Hopfer S, Zaharia O, Reid MC. 1985. Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats. Ann. Clin. Lab. Sci. 15: 229-236.
33. Tseng TH, Wang CJ, Kao ES, Chu HY. 1996. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butyl hydroperoxide in rat primary hepatocytes. Chem. Biol. Interact. 101:137-148.
34. Uchiyama M, Mihara M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem. 86:271-278.
35. Vassault A. 1983. Lactate dehydrogenase: UV-method with pyruvate and NADH. In: Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Grassl, M.(eds), "Methods of Enzymatic Analysis. III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases". Verlag-Chemie, Weinheim, p.118-126.