

## The Role of Solvent on Radiation Degradation and Antibacterial Activity of Chitosan Against *Pectobacterium Carotovorum*

F. Naimian\*, F. Khoylou, and R. Beteshobabrud

Nuclear Science and Technology Research Institute, Radiation Application Research School, Atomic Energy Organization of Iran, P.O. Box: 11365-3486, Tehran, Iran

Received 9 March 2010, accepted 27 November 2010

### ABSTRACT

Radiation degradation of chitosan is one of the most important methods to prepare antibacterial oligochitosans. In this study, the effect of solvent on the reduction of degradation dose and enhancement of the antibacterial activity of chitosan against *Pectobacterium Carotovorum* (PC) has been considered. Gamma radiation degradation was applied to chitosan as solid and aqueous solution at dose range of 2-200 kGy. The changes of molecular weight with irradiation dose which were monitored by viscometric measurements showed that the solvent led to the reduction of degradation dose. Therefore, the molecular weight of solid chitosan was reduced from 400,000 to 48,000 after irradiation at 50 kGy, whereas the molecular weight of aqueous solution of chitosan reached 32,000 after irradiation at 10 kGy. Antibacterial investigations showed that growth of PC in aqueous solution of chitosan irradiated at 10 kGy is equal to the growth of PC in solid chitosan irradiated at 50 kGy. FTIR spectra of the irradiated samples showed that the radiation degradation of chitosan in solid and aqueous solution must have occurred through the breakage of glycosidic bonds. The variations of glycosidic bond were in consistent with the viscometric results based on the effect of solvent on the reduction of degradation dose of chitosan.

#### Key Words:

chitosan,  
radiation degradation,  
antibacterial activity,  
glycosidic bond,  
molecular weight

(\*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: [fnaimian@aeoi.org.ir](mailto:fnaimian@aeoi.org.ir)

# اثر حلال بر تخریب پرتوی و فعالیت ضدباکتری کیتوسان در برابر پکتوباکتریوم کارتووروم

فرانک نعیمیان\*، فرح خویلو، رامسینا بت عیشو

تهران، سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کاربرد پرتوها، صندوق پستی ۳۴۸۶-۱۱۳۶۵

دریافت: ۸۸/۱۲/۱۸، پذیرش: ۸۹/۹/۶

## چکیده

تخریب پرتوی کیتوسان یکی از مهم‌ترین روش‌های تولید اولیگوکیتوسان‌های دارای خواص ضدباکتری است. در این کار پژوهشی، اثر حلال بر کاهش تخریب کیتوسان و افزایش خاصیت ضدباکتری آن در برابر باکتری پکتوباکتریوم کارتووروم (PC) بررسی شده است. برای این منظور، کیتوسان در حالت‌های جامد و محلول در استیک اسید در محدوده دوزهای ۲۰۰-۲ kGy به کمک تابش گاما پرتودهی شد. بررسی تغییرات وزن مولکولی با دوز پرتودهی به روش گرانروی سنجی نشان می‌دهد، وجود حلال منجر به کاهش قابل ملاحظه‌ای در دوز لازم برای افت وزن مولکولی کیتوسان می‌شود، به طوری که وزن مولکولی کیتوسان جامد پس از پرتودهی در دوز ۵۰ kGy از ۴۰۰۰۰۰ به ۴۸۰۰۰ می‌رسد، در حالی که کیتوسان محلول برای رسیدن به وزن مولکولی ۳۲۰۰۰ تنها به دوز ۱۰ kGy نیاز دارد. هم‌چنین، بررسی فعالیت ضدباکتری کیتوسان پرتودیده جامد و محلول نشان می‌دهد، رشد باکتری PC در کیتوسان محلول پرتودیده در دوز ۱۰ kGy معادل رشد باکتری در کیتوسان جامد پرتودیده در دوز ۵۰ kGy است. بر اساس طیف‌های FTIR، تخریب پرتوی کیتوسان در هر دو حالت جامد و محلول از راه شکست پیوندهای گلیکوزیدی انجام می‌شود. بررسی تغییرات پیوند گلیکوزیدی در این طیف‌ها تأییدی بر نتایج گرانروی سنجی مبنی بر اثر حلال در کاهش دوز تخریب کیتوسان است.

## واژه‌های کلیدی

کیتوسان،

تخریب پرتوی،

فعالیت ضدباکتری،

پیوند گلیکوزیدی، وزن مولکولی

\* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:

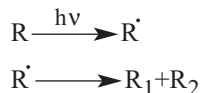
## مقدمه

روش پرتودهی یکی از راه‌های اصلاح مواد پلیمری است که از راه شبکه‌سازی، پیوندزنی یا تخریب پلیمر انجام می‌شود. در سال‌های اخیر، کاربرد برهم‌کنش‌های پرتو گاما و کیتوسان از راه پیوندزنی و تخریب بسیار مورد توجه قرار گرفته است. پیوند پرتوی کیتوسان با پلی استیرن، بوتیل آکریلات و ۲-هیدروکسی متاکریلات به ترتیب موجب افزایش خواص ازدیاد طول، مقاومت ضربه‌ای و سازگاری با خون این پلیمر طبیعی می‌شود [۱]. هم‌چنین، تخریب پرتوی کیتوسان منجر به بهبود برخی از خواص مانند فعالیت ضدباکتری، افزایش رشد گیاه و جذب یون‌های سنگین می‌شود [۲].

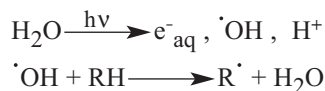
کیتوسان پلیمری طبیعی است که از استیل‌زدایی کیتین به دست می‌آید [۳]. کیتین از پوسته سخت پوستان دریایی مانند خرچنگ، میگو و صدف تهیه می‌شود [۴]. این پلیمر دارای خواص مطلوبی از قبیل زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و ضد میکروبی [۵] است و محصولات به دست آمده از تخریب این ماده، غیرسمی بوده و سرطان‌زا نیستند [۶،۷]. کیتوسان در زمینه‌های مختلفی مثل زیست‌فناوری، زیست‌داروها، صنایع کشاورزی، صنایع غذایی، صنایع آرایشی، بهسازی آب‌های آلوده و تهیه غشاهای کار گرفته می‌شود. از آن‌جا که کیتوسان در آب نامحلول است و فقط در استیک اسید رقیق حل می‌شود، موارد استفاده از آن محدود شده است. کاهش وزن مولکولی کیتوسان باعث بهبود انحلال‌پذیری آن می‌شود.

روش‌های مختلفی برای تخریب کیتوسان و تهیه اولیگو کیتوسان‌هایی با وزن مولکولی کم استفاده شده‌اند. از جمله، روش شیمیایی که روشی راحت و کم‌هزینه است، ولی بقایای شیمیایی و عدم تکرارپذیری از عمده‌ترین مشکلات این روش است [۸]. آب‌کافت آنزیمی نیز روشی مؤثر است، اما مراحل چندگانه ساخت آنزیم و خالص‌سازی محصول، استفاده از این روش را در مقیاس صنعتی با مشکل مواجه می‌کند [۹]. هم‌چنین، آب‌کافت کیتوسان با فسفریک اسید نیاز به زمان طولانی در حدود چند هفته دارد [۱۰]. بنابراین، استفاده از روش پرتوی که روشی سریع و راحت است، اخیراً مورد توجه قرار گرفته است [۱۱].

در اثر تابش پرتوهای یون‌ساز بر کیتوسان ساختار شیمیایی آن تخریب می‌شود و وزن مولکولی آن کاهش و خاصیت ضدباکتری آن افزایش می‌یابد [۲]. حالت ماده در هنگام پرتودهی (جامد یا محلول) اثر به‌سزایی بر بازده تخریب دارد. وقتی پلیمر جامد زیر تابش پرتوهای یون‌ساز قرار می‌گیرد، فقط اثر مستقیم پرتو بر ماده در مقدار تخریب اثر می‌گذارد [۱۲].



در حالی که در پرتودهی پلیمر در مجاورت یک حلال یا آب، افزون بر اثر مستقیم پرتو بر ماده، اثر غیرمستقیم تجزیه حلال یا آب به اجزای دیگر و اثر این اجزا روی پلیمر نیز مطرح می‌شود [۱۳].



از آن‌جا که سرعت و مقدار تولید رادیکال در حلال بیشتر از پلیمر است. بنابراین، رادیکال‌های تولید شده با زنجیرهای پلیمر وارد عمل شده و با جذب اتم هیدروژن از یک پلیمر، آن را به پلیمر رادیکالی تبدیل می‌کنند. به عبارت دیگر، تجزیه حلال در اثر تابش پرتو باعث افزایش واکنش‌های تخریب می‌شود [۱۴]. باکتری پکتوباکتریوم کارتووروم گونه‌ای از باکتری‌های گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری میله‌ای شکل است که باعث فساد بسیاری از گونه‌های گیاهان به ویژه انواع انباری آنها می‌شود. این باکتری باعث بیماری آوندی در هویج و سیب‌زمینی شده و منجر به فساد آنها می‌شود [۱۵].

در این پژوهش، اثر پرتو بر کیتوسان در دو حالت جامد و محلول در استیک اسید با یک‌دیگر مقایسه شده و دوز لازم برای کاهش وزن مولکولی برای بهبود خاصیت ضدباکتری کیتوسان در برابر باکتری PC بررسی شده است.

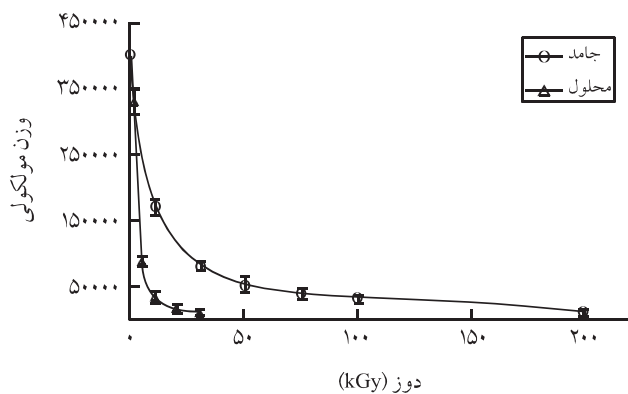
## تجربی

## مواد

کیتوسان استفاده شده در این پژوهش با وزن مولکولی متوسط ۴۰۰۰۰۰، ساخت شرکت Fluka، استیک اسید و سدیم‌بی‌کربنات از شرکت Merck، نوترینت برات از شرکت Difco آمریکا و باکتری پکتوباکتریوم کارتووروم زیرگونه کارتووروم (با نام قدیمی *Erwinia carotovora*) به شماره DMS 30170 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شده‌اند.

## دستگاه‌ها

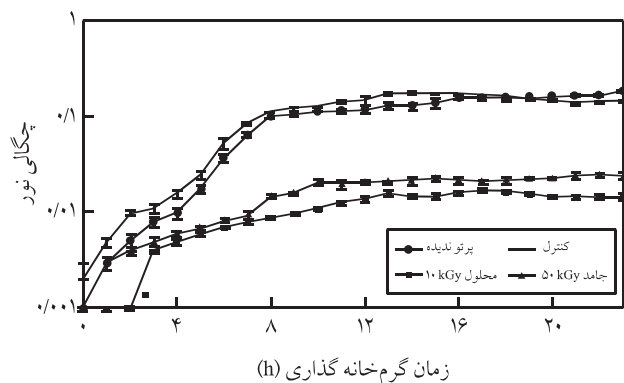
سلول گاما ۲۲۰ ساخت کانادا با دوز پرتودهی ۷۶۲ kGy/h برای نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. گرانروی سنج آبلهود برای اندازه‌گیری گرانروی محلول‌های پلیمری، طیف‌نورسنج Novaspac III ساخت شرکت Amersham انگلیس برای اندازه‌گیری جذب نوری و طیف‌سنج



شکل ۱ - تغییرات وزن مولکولی با دوز پرتو دهی برای کیتوسان پرتو دیده در حالت های جامد و محلول.

مشاهده می شود، پرتو دهی منجر به تخریب کیتوسان شده و وزن مولکولی کاهش می یابد. کاهش وزن مولکولی با دوز پرتو دهی، برای کیتوسان محلول بسیار سریع تر از کیتوسان جامد است و در دوزهای بسیار کمتر اتفاق می افتد. به طوری که وزن مولکولی کیتوسان جامد پس از پرتو دهی در دوز ۵ kGy از ۴۰۰۰۰۰ به ۴۸۰۰۰ می رسد، در حالی که برای کیتوسان محلول در دوز ۱۰ kGy، وزن مولکولی ۳۲۰۰۰ به دست می آید. همان طور که در مقدمه ذکر شد، تجزیه حلال با پرتو منجر به تولید رادیکال های بیشتری می شود. افزون بر این، در حالت جامد رادیکال های تولید شده محبوس می شوند و فعالیت کمی دارند، در حالی که در حالت محلول به علت تحرک بیشتر رادیکال ها، همان مقدار کاهش وزن مولکولی با دوز کمتر به دست آمده است.

فعالیت ضد باکتری کیتوسان با اندازه گیری مقدار کدورت در اثر رشد باکتری PC بررسی می شود. شکل ۲ چگونگی رشد این باکتری را در نمونه های کنترل (بدون کیتوسان)، پرتو ندیده، جامد ۵۰ kGy و



شکل ۲ - رشد پکتوباکتریوم کارتوروم در نمونه های کنترل، پرتو ندیده، جامد ۵۰ kGy و محلول ۱۰ kGy.

FTIR مدل IFS45 ساخت شرکت Bruker آلمان برای مشاهده تغییرات ساختار شیمیایی استفاده شد.

## روش ها

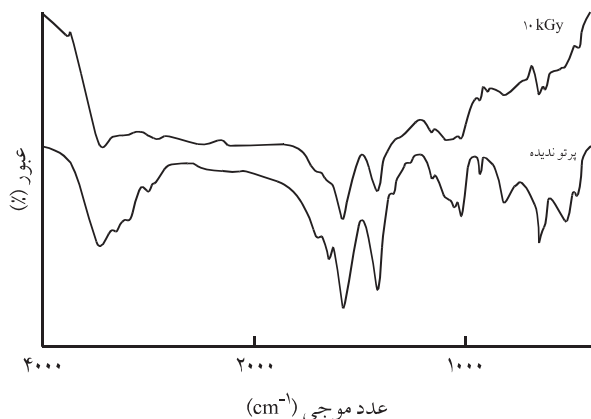
کیتوسان جامد در ظرف های پلی اتیلنی با دوزهای ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ kGy پرتو دهی شد. کیتوسان محلول از راه اختلاط کیتوسان جامد به مقدار ۱۰ w/v٪ در استیک اسید ۵ w/v٪ تهیه و با دوزهای ۲، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ kGy زیر تابش پرتو گاما قرار گرفت.

گرانروی نمونه های پرتو ندیده (شاهد) و پرتو دیده، با غلظت ۱٪ به کمک گرانروی سنج آبلهود اندازه گیری شد. برای این منظور محلول هایی از کیتوسان با غلظت ۱٪ از راه متورم سازی کیتوسان در استیک اسید ۱ نرمال تهیه شد. سپس، با محلول ۰/۵ مولار سدیم بی کربنات خنثی شد و pH محلول به ۶ رسانده شد. گرانروی محلول های پلیمری از تقسیم زمان عبور محلول به زمان عبور حلال ( $t/t_0$ ) به دست آمده و با استفاده از نمونه های استاندارد و تعیین ضریب تصحیح به وزن مولکولی مرتبط شد.

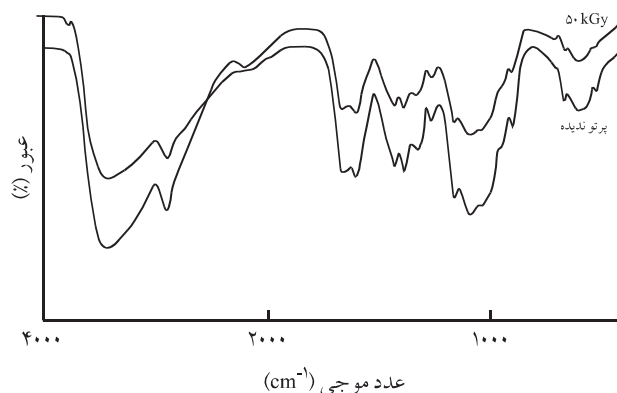
فعالیت ضد باکتری کیتوسان پیش و پس از پرتو دهی در حالت های جامد و محلول، با اندازه گیری چگونگی رشد باکتری PC بررسی شد. برای این منظور، ابتدا از غلظت ۰/۱۲۵ g/L کیتوسان پرتو ندیده صاف شده با صافی های Whatman با اندازه ۰/۲۲ mm برای رفع آلودگی میکروبی، غلظت های ۰، ۲/۶، ۵/۲، ۱۰/۴، ۲۰/۸ و ۴۰/۸ mg/L تهیه و کدورت آنها در نوترینت برات معین شد. بررسی ها نشان می دهد، ممانعت از رشد این باکتری در غلظت ۲۰/۸ mg/L بیشتر از سایر غلظت هاست. بنابراین، غلظت مزبور برای انجام آزمون میکروبی در نظر گرفته شد. از باکتری کشت داده شده در نوترینت برات پس از ۲۴ h گرم خانه گذاری در ۳۰°C کدورت معادل ۰/۵ Mc. Farland (جذب نوری ۰/۱ - ۰/۰۸ در طول موج ۶۵۰ nm) تهیه شد. مقدار ۱۰ mL از باکتری با کدورت حاصل به ۳ mL از هر کدام از نمونه های کیتوسان پرتو ندیده و پرتو دیده افزوده شده و در دمای ۳۰°C به مدت حداکثر ۲۹ h گرم خانه گذاری شدند. جذب نوری باکتری در نمونه های کیتوسان هر یک ساعت یک مرتبه با طول موج ۶۵۰ nm با طیف نورسنج Novaspac III ثبت شد. بررسی تغییرات ساختار شیمیایی، به کمک دستگاه FTIR و به روش تهیه قرص KBr انجام شد.

## نتایج و بحث

شکل ۱ تغییرات وزن مولکولی با دوز پرتو دهی را برای کیتوسان پرتو دیده در حالت های جامد و محلول نشان می دهد. در این شکل



شکل ۴ - طیف زیر قرمز کیتوسان محلول پرتو ندیده و پرتو دیده با دوز ۱۰ kGy.



شکل ۳ - طیف زیر قرمز کیتوسان جامد پرتو ندیده و پرتو دیده با دوز ۵۰ kGy.

طیف FTIR کیتوسان پرتو ندیده و پرتو دیده در حالت های جامد و محلول به ترتیب در شکل های ۳ و ۴ آمده است. در طیف FTIR، پیک های  $893\text{ cm}^{-1}$  و  $1153\text{ cm}^{-1}$  متعلق به ساختار ساخاریدی،  $1575\text{ cm}^{-1}$  آمید نوع دوم،  $1080\text{ cm}^{-1}$  پیوند گلیکوزیدی و  $3345\text{ cm}^{-1}$  گروه هیدروکسیل است [۱۷، ۱۸]. مقایسه کیتوسان پرتو ندیده و پرتو دیده در حالت جامد (شکل ۳) نشان می دهد، پس از پرتو دهی هیچ تغییری در ساختار شیمیایی کیتوسان به وجود نیامده است. عدم تشکیل پیوند جدید در بین ناحیه  $1900\text{ cm}^{-1}$  -  $1650\text{ cm}^{-1}$  گویای این امر است که گروه های اکسیدی مثل کربوکسیل یا آلدهید در کیتوسان پرتو دیده به وجود نیامده است. هم چنین، ارتعاشات خمشی مربوط به  $\beta$ -پیرانوز با پیک  $900\text{ cm}^{-1}$  نشان دهنده بقای این عامل است. کلیه این شواهد نشان می دهد، پرتو دهی کیتوسان جامد منجر به باز شدن حلقه و اکسید شدن آن نمی شود. به طوری که در این شکل مشاهده می شود، در اثر پرتو دهی ساختار ساخاریدی و آمید نوع دوم کاهش می یابد ولی از بین نمی رود. از کوتاه و پهن شدن پیوند گلیکوزیدی ( $1080\text{ cm}^{-1}$ ) می توان نتیجه گرفت که تخریب پرتوی کیتوسان از راه شکست پیوندهای گلیکوزیدی اتفاق می افتد.

در طیف های FTIR کیتوسان پرتو ندیده و پرتو دیده در حالت محلول (شکل ۴) هم مانند حالت جامد هیچ پیوند جدیدی تشکیل نشده و هیچ پیوندی به طور کامل از بین نرفته است. ساختار ساخاریدی و آمید نوع دوم کاهش یافته و پیوند گلیکوزیدی کوتاه تر و پهن تر شده است. مجموعه این تغییرات نشان می دهد، در حالت محلول هم مانند حالت جامد، تخریب پرتوی با شکست پیوندهای گلیکوزیدی انجام می شود و ساختار ساخاریدی آن از بین نمی رود.

محلول ۱۰ kGy نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود، کیتوسان پرتو ندیده در مقایسه با نمونه کنترل، در ساعات اولیه کدورت کمتری نشان می دهد. به عبارت دیگر، باکتری رشد کمتری داشته است. این مسئله گویای این است که کیتوسان به طور ذاتی خاصیت ضدباکتری دارد. هم چنین شکل مزبور نشان می دهد، نمونه های کیتوسان پرتو دیده کدورت به مراتب کمتری را ایجاد می کنند که نشان دهنده اثر پرتو دهی در افزایش خاصیت ضدباکتری کیتوسان است. مقایسه فعالیت ضدباکتری بین نمونه های پرتو دیده جامد و محلول نشان می دهد، کیتوسان محلول پرتو دیده در دوز ۱۰ kGy، ضمن داشتن زمان تعویق ۲ h کدورت مشابهی را نسبت به کیتوسان جامد پرتو دیده در دوز ۵۰ kGy ایجاد کرده است. این نتیجه که نشان دهنده کاهش دوز پرتو دهی و افزایش خاصیت ضدباکتری نمونه محلول نسبت به نمونه جامد است، به علت تجزیه مخلوط حلال - آب و تشکیل رادیکال های آزاد است که منجر به شکست بیشتر پیوندهای کیتوسان و کاهش وزن مولکولی پلیمر در دوز های کم می شود.

ساز و کار عملکرد ضدباکتری کیتوسان با نشستن بر سطح باکتری است. کیتوسان قابلیت عمل با ترکیبات سطحی باکتری را دارد و جذب سطح باکتری می شود. بدین ترتیب، لایه ای نفوذناپذیر در اطراف باکتری تشکیل می شود و کانال های حیاتی باکتری را می بندد. این لایه مانع نفوذ مواد غذایی به باکتری شده و منجر به مرگ باکتری می شود [۱۵، ۱۶]. مولکول کیتوسان با داشتن وزن مولکولی زیاد، نمی تواند به راحتی لایه منسجمی روی باکتری تشکیل دهد. وقتی وزن مولکولی کیتوسان در اثر پرتو دهی کاهش می یابد، لایه نفوذناپذیر روی باکتری راحت تر تشکیل می شود و در نتیجه فعالیت ضدباکتری کیتوسان به مقدار چشم گیری افزایش می یابد.

## نتیجه گیری

مولکولی کیتوسان، تشکیل لایه نفوذناپذیر روی باکتری و انسداد کانال‌های حیاتی آن راحت‌تر انجام می‌شود، خاصیت ضدباکتری کیتوسان پرتودیده بهبود می‌یابد. بهبود فعالیت ضدباکتری برای کیتوسان پرتودیده در حالت محلول در دوزهای کمتر نسبت به حالت جامد رخ می‌دهد.

نتایج به دست آمده از بررسی‌های FTIR نشان می‌دهد، تخریب پرتوی کیتوسان در هر دو حالت جامد و محلول با شکست پیوندهای گلیکوزیدی انجام می‌گیرد و ساختار ساخاریدی آن از بین نمی‌رود. این امر، مزیت روش پرتوی در کاهش وزن مولکولی و افزایش فعالیت ضد میکروبی کیتوسان به شمار می‌رود.

## مراجع

- Zohuriaan-Mehr M.J., Advances in Chitin and Chitosan Modification through Graft Copolymerization: A Comprehensive Review, *Iran. Polym. J.*, **14**, 235-265, 2005.
- Kume T., Nagasawa N., and Yoshii F., Utilization of Carbohydrates by Radiation Processing, *Radiat. Phys. Chem.*, **63**, 625-627, 2002.
- Mirzadeh H. and Yaghobi N., Enhancement of Chitin's Degree of Deacetylation by Multistage Alkali Treatments, *Iran. Polym. J.*, **13**, 131-136, 2004.
- Mirzadeh H., Hormozi F., Mohagheghi M.A., Yaghobi N., Amanpour S., and Ahmadi H., Preparation of Chitosan Derived from Shrimps Shell of Persian Gulf as a Blood Hemostasis Agent, *Iran. Polym. J.*, **11**, 63-68, 2002.
- Li X., Feng X., Yang S., Wang T., and Su Z., Effects of Molecular Weight and Concentration of Chitosan on Antifungal Activity Against *Aspergillus Niger*, *Iran. Polym. J.*, **17**, 843-852, 2008.
- Muzzarelli R.A.A., *Chitin*, Pergamon, UK, 62-86, 1977.
- Yen M., Yang J., and Mau J., Physicochemical Characterization of Chitin and Chitosan from Crab Shells, *Carbohydr. Polym.*, **75**, 15-21, 2009.
- Qin C.Q., Du Y.M., and Xiao L., Effect of Hydrogen Peroxide Treatment on the Molecular Structure of Chitosan, *Polym. Degrad. Stab.*, **76**, 211-218, 2002.
- Qin C., Du Y., Zong L., Zeng F., Liu Y., and Zhou B., Effect of Hemicellulase on the Molecular Weight and Structure of Chitosan, *Polym. Degrad. Stab.*, **80**, 435-441, 2003.
- Hasegawa M., Isogai A., and Onabe F., Preparation of Low - Molecular Weight Chitosan Using Phosphoric Acid, *Carbohydr. Polym.*, **20**, 279-283, 1993.
- Ulanski P. and Rosiak J., Preliminary Studies on Radiation-Induced Changes in Chitosan, *J. Rad. Phys. Chem.*, **39**, 53-57, 1992.
- Kang B., Dai Y., Zhang H., and Chen D., Synergetic Degradation of Chitosan with Gamma Radiation and Hydrogen Peroxide, *Polym. Degrad. Stab.*, **92**, 359-362, 2007.
- Fossey J., Lefort D., and Sorba J., *Free Radicals in Organic Chemistry*, John Wiley and Sons, 1995.
- IAEA, Radiation Synthesis and Modification of Polymers for Biomedical Applications, IAEA-TECDOC-1324, 20, 2002.
- Wikipedia, [http://www.wrongdiagnosis.com/medical/pectobacterium\\_carotovorum.htm](http://www.wrongdiagnosis.com/medical/pectobacterium_carotovorum.htm) available in 27 February 2010.
- Uchida Y., Antimicrobial Activity by Chitin and Chitosan, *Food Chem.*, **2**, 22-29, 1998.
- Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F.M., Arguelles-Monal W., Desbrieres J., and Rinaudo M., An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization, *Polymer*, **42**, 3569- 3580, 2001.
- Shao J., Yang Y., and Zhong q., Studies on Preparation of Oligo-glucosamine by Oxidative Degradation under Microwave Irradiation, *Polym. Degrad. Stab.*, **82**, 395-398, 2003.