✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۵، زمستان ۱۳۷۸

اثر تزریق اگونیست GnRH و تحریک سرویکس بر آزادکردن تخمک از تخمدان در شترهای یک کوهانه نابالغ و بالغ ایران

● همایون خزعلی، دانشگاه تربیت مدرس ● محمد هاشمی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: مردادماه ۱۳۷۸

چکیده

ثابت شده است که استفاده از هورمون‌ها FSH[1]، GnRH[2]، HCG[3]، LH[4] و PMSG[5]، باعث رشد و نمو فولیکول و آزاد شدن تخمک از فولیکول تخمدان پستانداران می‌شود. هدف از اجرای این تحقیق، بررسی استفاده از اگونیست GnRH (فرتاژیل) و تحریک سرویکس، جهت آزادکردن تخمک از فولیکول تخمدانهای شترهای ماده بالغ به منظور هماهنگ کردن اوولاسیون و نابالغ به منظور تعیین فعالیت غده هیپوفیز و تخمدان و زودرس کردن سن آبستنی بود. تعداد بیست و دو نفر شتر دو، سه و چهار ساله به طور تصادفی به دوگروه تقسیم و به همه حیوانات مزبور پروژسترون تزریق شد. نمونه‌های خون در روزهای صفر، ۱+، ۳+، ۵+، ۷+، ۱۰+ و ۱۵+ از رگ وداج حیوانات هر دوگروه توسط ونوجکت گرفته شد. هورمون پروژسترون در کلیه نمونه‌های خون با استفاده از تکنیک RIA[6] اندازه‌گیری و داده‌ها توسط طرح آماری فاکتوریل ۲×۷×۳ آنالیز گردید، اختلاف بین میانگین غلظت پروژسترون پلاسمای شترهای دو، سه و چهار ساله بعد از تزریق GnRH (۳/۵۸±۰/۸۰۸ ng/ml) با میانگین غلظت پروژسترون پلاسما قبل از تزریق GnRH (۰/۵۳۹±۰/۰۸۲ ng/ml) معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). تفاوت میانگین غلظت پروژسترون پلاسمای شترهای چهارساله بعد از تحریک سرویکس (۳/۵۷۶±۱/۰۱۷ ng/ml) با میانگین غلظت پروژسترون قبل از تحریک سرویکس (۰/۵۷۰±۰/۰۶۷ ng/ml) معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). ولی تفاوت میانگین غلظت پروژسترون شترهای دو و سه ساله قبل و بعد از تحریک سرویکس معنی‌دار نبود (P<۰/۰۱). این نتایج نشان می‌دهد که غده هیپوفیز و تخمدان در شترهای نابالغ آماده فعالیت می‌باشند و اگر فاکتور GnRH از غده هیپوفیز آزاد گردد سن بلوغ را می‌توان کاهش داد، همچنین سنتز گیرنده‌های سرویکس پس از بروز بلوغ در شترها صورت می‌گیرد.

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 45 PP: 114-117

The effect of GnRH agonist and cervix stimulation on ovulation in pre- and pubertal camels of Iran.

By: Khazali, H. & Hashemi M.; Tarbiat Moderres University.

It has been well established that injection of gonadotropin releasing hormone (GnRH) mediates ovulation and luteinizing hormone (LH) secretions in most mammals. The goal of this study was to determine whether GnRH injections and cervix stimulation cause ovulation in pre - and pubertal camel. Twenty two pre - and pubertal camels were randomly assigned to an experiment with a 2x2 factorial design. All animals received injections of progesterone (P4) on day 1 of expriment. Camels were either received 1 ug of GnRH/Kg BW or cervix stimulation on day 3 of experiment. Blood samples were collected on day 0, +1, +3, +5, +7, +10 and +15 of experiment. Samples were assayed for P4 by double - antibody RIA. Mean plasma P4 concentrations were significantly higher (P<0.01) after injection of 1 Ug GnRh/kg BW in 2, 3 and 4 year old camels. Mean plasma P4 concentrations were significantly higher (P<0.01) after stimulation of cervix in 4 year old but not in 2 and 3 year old camels. Results of this study suggest that the pituitary - ovary axis of the pre - and pubertal camels is responsive to injection of GnRH. Also stimulation of cervix may cause release of GnRH in the pubertal camels but not prepubertal which indicates the receptors of cervix are active in pubertal camels but this phenomenon is not developed in prepubertal camels.

مقدمه

شتر حیوانی است که اولین سیکل فحلی آن در چهار سالگی اتفاق می‌افتد. معمولاً شروع بلوغ با فاز فولیکولی همراه بوده و این عمل با افزایش میانگین غلظت هورمون LH در پلاسمای خون رخ می‌دهد. لذا شناخت مکانیسم کنترل کننده ترشح هورمون LH در مرحله قبل از بلوغ گامی مثبت به منظور زودرس کردن اولین سیکل فولیکولی در شتر می‌باشد. به خوبی مشخص شده است که افزایش فرکانس و دامنه پالسهای هورمون GnRH باعث افزایش دامنه پالسهای هورمون LH می‌شود که در رشد فولیکول اثر مثبت می‌گذارد (۵). البته در حیواناتی نظیر شتر و خرگوش که تخمک‌گذاری شرطی است، تحریک سرویکس نیز به صورت مکانیکی و یا در حین آمیزش منجر به آزاد شدن هورمون LH می‌شود.

مطالعاتی که با تزریق داخل عضلانی تعدادی از هورمونهای تولید مثلی در شترهای بالغ انجام گرفت، نشان داد که تزریق هورمون GnRH با دزهای مختلف، با تأثیر در دامنه و فرکانس هورمون LH، باعث افزایش تخمک‌گذاری شده و راندمان آبستنی در شتر ماده (آروانه) را افزایش می‌دهد (۲). تحقیقاتی که توسط محققان روی میش‌های بالغ آنستروس انجام گرفت، نشان داد که تزریق داخل عضلانی GnRH باعث تحریک رهاسازی هورمون محرک جسم زرد شده و لذا از این هورمون GnRH به صورت وسیعی در میش‌های آنستروس مورد استفاده قرار گرفت (۳).

با توجه به اینکه در حیواناتی که Induced ovulator هستند، جهت رهایی تخمک نیاز به تحریکات سرویکسی است. مطالعاتی در رابطه با مکانیسم تحریک سرویکس به منظور اوولاسیون در شترهای بالغ انجام گرفته، بیانگر این است که رها شدن تخمک در شتر نیاز به آمیزش یا تحریکات مکانیکی و الکتریکی گیرنده‌های سرویکس می‌باشد به طوری که در طول فصل آمیزش تا زمانی که آروانه جفت‌گیری نکرده هست، فاز فولیکولی همچنان تکرار می‌شود (۷).

Chen و همکاران در سال ۱۹۸۵ نشان دادند که سوار شدن به همراه دخول پنیس در واژن به منظور فراهم ساختن تحریکات لازم جهت رهایی LH و رها شدن تخمک در آلپاکا که بالغ ضروری است. در این بین نقش شتر نر (لوک) در القاء اوولاسیون مورد مطالعه قرار گرفت و نشان داده شد که توانایی لوک در این رابطه ۸۵

درصد می‌باشد (۴). در حالی که لوک وازکتومی شده ۷۵ درصد توانایی در القاء رهایی تخمک را داراست. به طوری که آمیزش بدون اوولاسیون ناشی از عدم دخول کافی آلت نر در اندام تناسلی ماده است (۲).

با توجه به اهمیت هورمون GnRH و تحریک سرویکس روی تخمک‌گذاری شترهای نابالغ به منظور تعیین فعالیت غده هیپوفیز و تخمدان و زودرس کردن سن آبستنی و در شترهای بالغ به منظور هماهنگ کردن اوولاسیون بود.

مواد و روشها

تعداد ۲۲ نفر شتر ماده یک کوهانه دو، سه و چهار ساله به صورت تصادفی از میان ۲۱۰ شتر ماده انتخاب شده و به دو دسته و هر دسته به سه گروه، دو، سه و چهار ساله تقسیم شد. در هر دسته، تعداد شترهای دو و سه ساله، ۴ نفر و تعداد شترهای چهار ساله سه نفر بود. متوسط وزن شترهای دو ساله (۴±۲۰۸) کیلوگرم، سه ساله (۵±۲۷۴) کیلوگرم و چهار ساله‌ها (۱۰±۳۱۶) کیلوگرم بود. در ابتدا به تمامی شترهای محلول سرم فیزیولوژیک ۰/۰۰۹ تزریق کرده از تمامی آنها یک بار نمونه خونی تهیه گردید و به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس به هر یک از آنها حدود ۲۵۰ میلی‌گرم هورمون پروژسترون به فاصله سه روز تزریق شد که این تزریق پروژسترون باعث هماهنگ کردن سیکل فولیکولی در شترهای گروه‌های مختلف گردید و با توجه به اندازه‌گیری پروژسترون پلاسمای حیوانات گروه‌های مختلف این هماهنگی فاز فولیکولی مشخص گردید. سه روز بعد از تزریق پروژسترون، به دسته اول به میزان یک میکروگرم به ازاء هر کیلوگرم وزن زنده، هورمون فرتاژیل به صورت عضلانی تزریق گردید و به وسیله کانترهای پلاستیکی تحریک سرویکس حیوانات گروه دوم صورت گرفت. بعد از اعمال تیمارهای مورد نظر، نمونه‌های خونی در روزهای صفر، ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۵ به وسیله لوله‌های خلاءدار (ونوجکت) که حاوی مواد ضد انعقادی سیترات سدیم به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر بود به میزان ۵ میلی لیتر از ورید وداجی شترها جمع‌آوری گردید. سپس شماره شترها، روی نمونه خون ثبت و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شده و با دستگاه سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، پلاسمای نمونه‌ها جدا شده و با استفاده از پیپت‌های یک بار مصرف پاستور، این سرم در لوله‌های پلاسیکی درب‌دار وارد کرده و در فریزر در دمای ۲۰- (درجه سانتیگراد) نگهداری نموده تا به آزمایشگاه دانشکده منتقل شود. جهت اندازه‌گیری میزان هورمون پروژسترون پلاسما در نمونه‌های سرم از روش سنجش RIA استفاده شد.

نتایج

تزریق فرتاژیل در شترهای دسته یک باعث افزایش معنی‌داری در غلظت پروژسترون پلاسمای شترهای ۲، ۳ و ۴ ساله شد. به طوری که اختلاف میانگین غلظت هورمون پروژسترون در شترهایی با سنین مختلف که با هورمون GnRH تیمارشده‌اند(۰/۸۰۸±۳/۵۸۰ng/ml) در مقایسه با قبل از تزریق (۰/۰۸۲±۰/۵۳۹ng/ml) بسیار معنی‌دار است. به رغم این مساله همانگونه که از شکل ۱ مشخص است، اختلاف میانگین غلظت پروژسترون برای شترهایی که با هورمون GnRH تیمار شده‌اند، در سنین مختلف معنی‌دار نیست.

از طرف دیگر، منحنی تغییرات غلظت پروژسترون برای شترهایی با سنین مختلف در طی روزهای خونگیری بعد از تزریق هورمون فرتاژیل (فرم مصنوعی هورمون GnRH)، نشان می‌دهد که تفاوت میزان هورمون پروژسترون از روز اول تا روز پانزدهم خونگیری معنی‌دار نبوده است و این نشان دهنده معنی‌دار نبودن اثر متقابل بین روزهای خونگیری و فرتاژیل هست. به عبارتی بهتر، اثر تزریق در روزهای مختلف خونگیری هیچ تأثیری در روند تغییر غلظت پروژسترون در پلاسمای شترها با سنین مختلف نداشته است.

که این مهم با بررسی مقایسه میانگین و انحراف معیار گروه‌های مختلف سنی بعد از تزریق بیشتر مشخص می‌شود.

مقایسه میانگین غلظت پروژسترون در خون شترهای ۲، ۳ و ۴ ساله که با تحریک سرویکس تیمار شده‌اند، در مقایسه با قبل از تحریک نشان می‌دهد که تحریک سرویکس در شترهای دو و سه ساله (A۰/۵۷۰±۰/۰۶۷ng/ml) در مقایسه با قبل از تحریک (A۰/۵۵۵±۰/۱۶۰ng/ml) باعث تغییر معنی‌داری در غلظت پروژسترون پلاسما نمی‌شود در صورتی که تحریک سرویکس در شترهای چهارساله (A۳/۵۷۳±۱/۰۱۷ng/ml) باعث تغییر معنی‌داری در غلظت پروژسترون در مقایسه با قبل از تحریک و شترهای ۲ و ۳ ساله می‌شود.

این نتیجه توسط منحنی تغییرات غلظت هورمون پروژسترون برای شترهایی با سنین مختلف که در مدت دو هفته بعد از تحریک سرویکس خونگیری شده‌اند، نیز تایید می‌شود که تفاوت میزان هورمون پروژسترون از روز اول تا روز پانزدهم برای شترهای با سنین دو و سه ساله تقریباً مشابه هم بوده است و اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نمی‌شود. ولی روند تغییرات هورمون پروژسترون در شترهای چهار ساله در مقایسه با شترهای دو و سه ساله‌ای که تحت تحریک سرویکسی قرار گرفته بودند، بسیار معنی‌دار هست و این نشان دهنده معنی‌دار بودن اثر متقابل روزهای خونگیری و تحریک سرویکس در شترهای با سنین مختلف است. به عبارت بهتر، تحریک سرویکس در روزهای مختلف خونگیری تأثیر متفاوت در روند تغییر غلظت پروژسترون پلاسمای شترها به تفکیک سن داشته است.

این روند با بررسی مقایسه میانگین از انحراف معیار گروه‌های مختلف سنی شترها بعد از تحریک سرویکس بهتر مشخص می‌شود.

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که میانگین غلظت هورمون پروژسترون پلاسما بعد از تزریق فرتاژیل (GnRH) در حیوانات هر گروه اول از (۰/۸۰۸±۳/۵۸۰ng/ml) افزایش یافت و این افزایش در سطح (P<۰/۰۱) معنی‌دار بود. این نتیجه با نتایجی که در تحقیق‌هایی توسط Rettner و همکاران وی روی تلیسه‌های بالغ و نابالغ انجام دادند، مشابه بود. همچنین مقایسه میانگین غلظت پروژسترون در شترهای ۲، ۳ و

	گروه دو ساله	گروه سه ساله	گروه چهار ساله
۱	A ۳/۱۳۹ ± ۱/۴۷۷ ng/ml	A ۳/۲۸۹ ± ۱/۰۹۴ ng/ml	A ۲/۸۸۸ ± ۰/۴۰۹ ng/ml
۳	A ۳/۱۱۳ ± ۰/۷۱۳ ng/ml	A ۳/۲۹۱ ± ۰/۸۹۴ ng/ml	A ۲/۵۲۹ ± ۰/۶۸۵ ng/ml
۵	A ۳/۲۷۳ ± ۱/۰۶۷ ng/ml	A ۳/۳۳۰ ± ۰/۷۵۸ ng/ml	A ۲/۸۵۵ ± ۰/۹۷۷ ng/ml
۷	A ۳/۹۹ ± ۰/۳۹۳ ng/ml	A ۳/۶۳۸ ± ۱/۱۲۴ ng/ml	A ۳/۰۱۶ ± ۱/۲۳۸ ng/ml
۱۰	A ۲/۸۶۶ ± ۰/۶۱۴ ng/ml	A ۲/۸۸۵ ± ۰/۸۴۹ ng/ml	A ۳/۰۲۷ ± ۱/۰۲۶ ng/ml
۱۵	A ۳/۹۱۸ ± ۱/۵۰۴ ng/ml	A ۴/۰۸۴ ± ۱/۷۵۶ ng/ml	A ۴/۲۴ ± ۰/۷۱۴ ng/ml

	گروه دو ساله	گروه سه ساله	گروه چهار ساله
۱	A ۰/۳۸۴ ± ۰/۱۱۰ ng/ml	A ۰/۳۱۷ ± ۰/۱۰۰ ng/ml	A ۳/۹۷۵ ± ۰/۴۰۶ ng/ml
۳	A ۰/۶۳۴ ± ۰/۱۲۶ ng/ml	A ۰/۵۷۹ ± ۰/۱۱۳ ng/ml	A ۳/۴۰۶ ± ۰/۶۸۵ ng/ml
۵	A ۰/۶۲۹ ± ۰/۰۸۲ ng/ml	A ۰/۴۵۳ ± ۰/۰۶۴ ng/ml	A ۳/۳۷۷ ± ۰/۹۷۸ ng/ml
۷	A ۰/۶۲۸ ± ۰/۱۷۵ ng/ml	A ۰/۴۹۶ ± ۰/۱۶۰ ng/ml	A ۳/۹۱۸ ± ۱/۲۴۷ ng/ml
۱۰	A ۰/۶۸۲ ± ۰/۲۱۶ ng/ml	A ۰/۵۵۲ ± ۰/۱۵۸ ng/ml	A ۳/۹۵۶ ± ۱/۰۲۶ ng/ml
۱۵	A ۰/۵۲۱ ± ۰/۲۲۷ ng/ml	A ۰/۴۳۳ ± ۰/۲۳۴ ng/ml	A ۳/۰۹۱ ± ۰/۷۱۸ ng/ml

در شترهای ۴ ساله‌ای که با GnRH تیمار شده‌اند، نشان می‌دهد که اختلاف غلظت پروژسترون در آنها معنی‌دار نبوده است به عبارت دیگر در شترهای دو و سه ساله‌ای که نابالغ می‌باشند نیز افزایش میزان پروژسترون معادل با افزایش پروژسترون در شترهای چهار ساله بالغی است که تحت تیمار GnRH بودند. لذا نتایج به دست آمده بیانگر این نکته است که در شترهای ماده نابالغ، اگر هورمون GnRH از هیپوتالاموس ترشح شود، حتی طی دوران قبل از بلوغ غده هیپوفیز توانایی فعالیت و تولید هورمون LH را دارد.

در فصل پاییز غلظت و دامنه پالسهای هورمون LH در شترهای دو ساله نسبت به شترهای سه و چهار ساله پایین‌تر است. به دلیل این که در شترهای دو ساله، رسپتورهای استروئیدی در هیپوتالاموس رشد و توسعه کافی نداشته و تحت کنترل مثبت هورمونهای استروئیدی نیست لذا ترشح GnRH و متعاقب آن LH کم صورت گرفته و در نتیجه غلظت و دامنه پالسهای هورمون LH پایین‌تر باقی می‌ماند (۵).

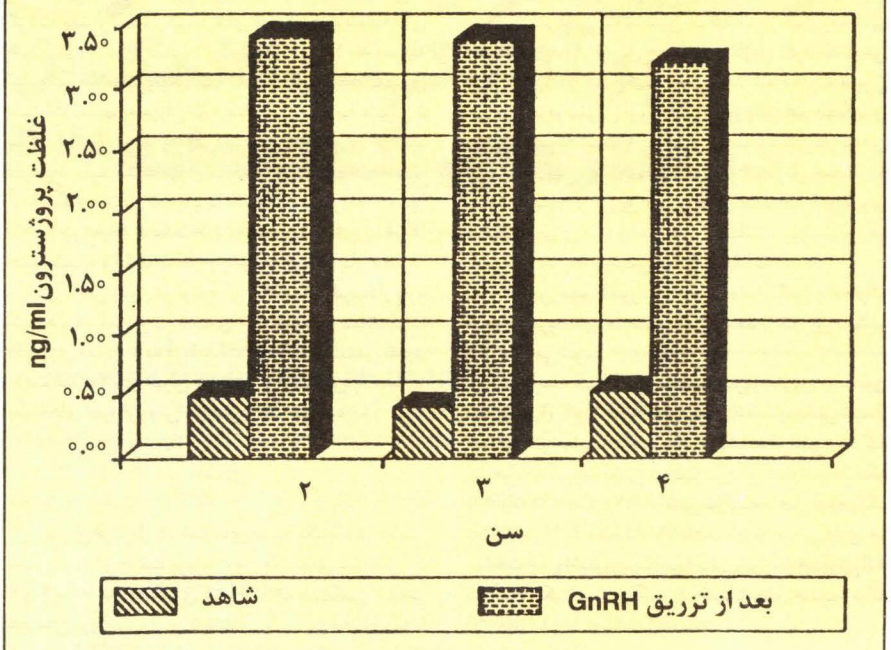
در شترهای سه ساله با افزایش فعالیت محور هیپوتالاموس - هیپوفیز غلظت و دامنه پالسهای هورمون LH به تدریج افزایش می‌یابد ولی به دلیل رشد ناکافی تخمدانها و نبودن کنترل مثبت استرادیول روی هیپوتالاموس، ترشح LH رخ نمی‌دهد.

در شترهای دو ساله فعالیت گنادی محور هیپوتالاموس - هیوفیز کم است ولی با افزایش سن تا هنگام بلوغ فعالیت محور هیپوتالاموس - هیپوفیز تخمدان افزایش یافته و میانگین غلظت، دامنه، فرکانس پالسهای LH به تدریج افزایش می‌یابد تا اینکه در نزدیک سن بلوغ این افزایش در ترشح LH الگوی ثابتی پیدا می‌کند (۵).

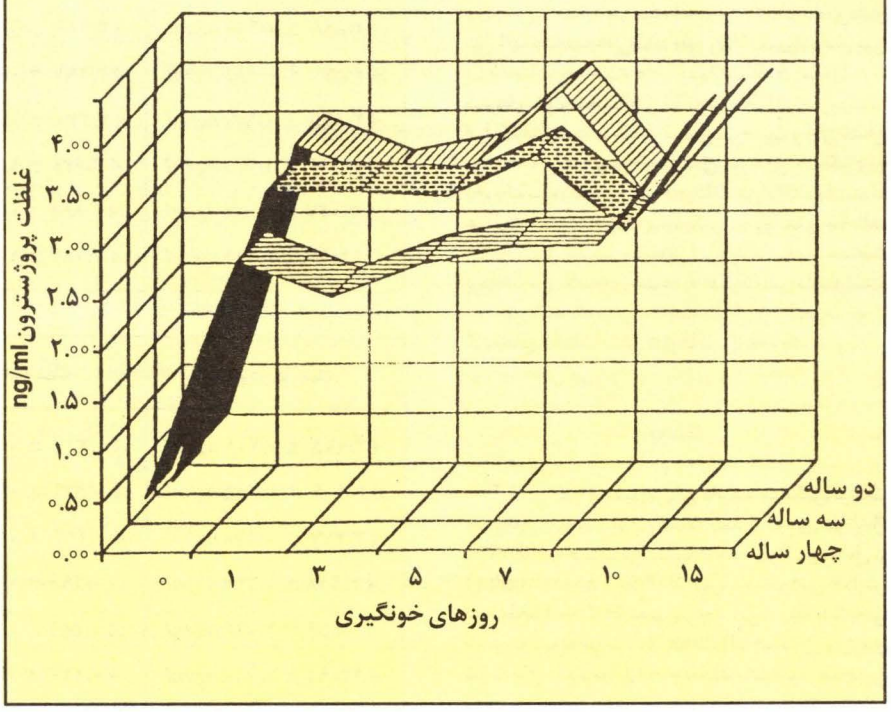
نتایج حاصل بر روی حیوانات گروه دوم که تحت تحریک سرویکسی بودند، نشان می‌دهد که میانگین غلظت هورمون پروژسترون پلاسما بعد از تحریک سرویکس در شترهای چهار ساله از (۰/۵۷ ± ۰/۰۶۷ng/ml) تا (۳/۵۷۳ ± ۱/۰۱۷ng/ml) به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P<0/01$). ولی این افزایش میانگین غلظت هورمون پروژسترون پلاسما در شترهای ۲ و ۳ ساله بعد از تحریک سرویکس مشاهده نشده است. نتایج این تحقیقات با نتایج تحقیقات Agarwal و Khanna (۱۹۹۱) مشابه است. نتایج این تحقیق بیانگر این است که تحریک سرویکس در شترهای دو و سه ساله روی تخمک‌گذاری بی‌تأثیر است که عدم شکل‌گیری گیرنده‌ها موجود در واژن، سرویکس و رحم را بیان می‌کند. به این ترتیب نرونهای مربوط تحریک نشده و باعث آزادسازی GnRH و LH نمی‌شود تا تخمک‌گذاری صورت پذیرد. ولی ظاهراً در شترهای چهارساله گیرنده‌ها شکل گرفته و باعث فرستادن پالس‌های عصبی از گیرنده‌های دستگاه تناسلی به ناحیه پری‌اپتیک (POA) هیپوتالاموس می‌شود که متعاقب آن GnRH surge حاصل شده که باعث LH-Surge شده و باعث شکسته شدن دیواره فولیکولی و در نهایت تخمک‌گذاری می‌شود.

در دوران قبل از بلوغ، کاهش گیرنده‌های استروئیدی در منطقه پری اپتیک و آرکیوت نوکلئوس سبب می‌شود که فرکانس و دامنه پالس ترشحات GnRH از منطقه آرلیوت نوکلئوس در حد پایین باشد و

شکل شماره ۱- مقایسه میانگین غلظت هورمون پروژسترون در شترهای ۲، ۳ و ۴ ساله، بعد از تزریق GnRH

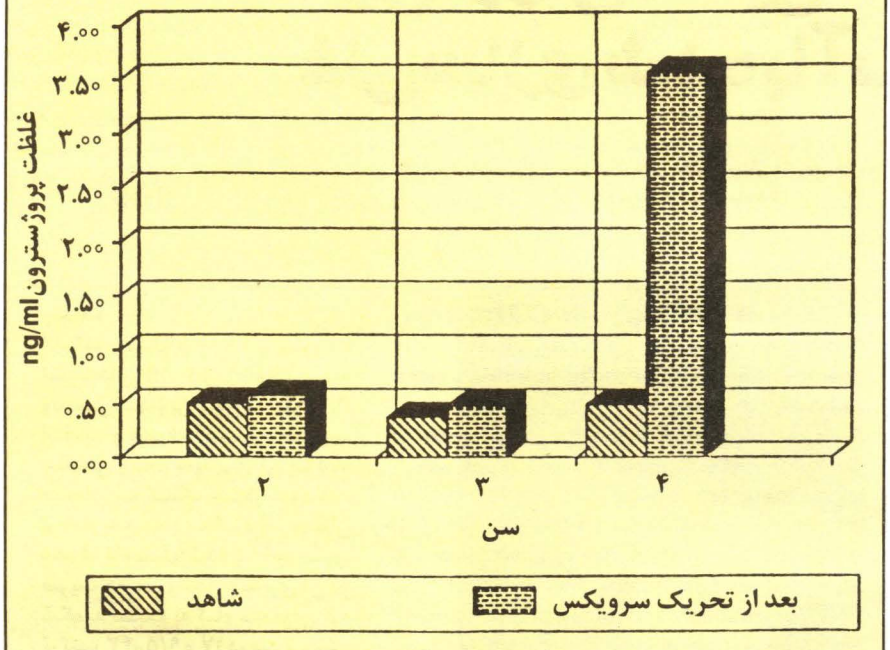


شکل شماره ۲- مقایسه میانگین غلظت هورمون در شترهای ۲، ۳ و ۴ ساله، بعد از تزریق GnRH در طی دو هفته خونگیری.

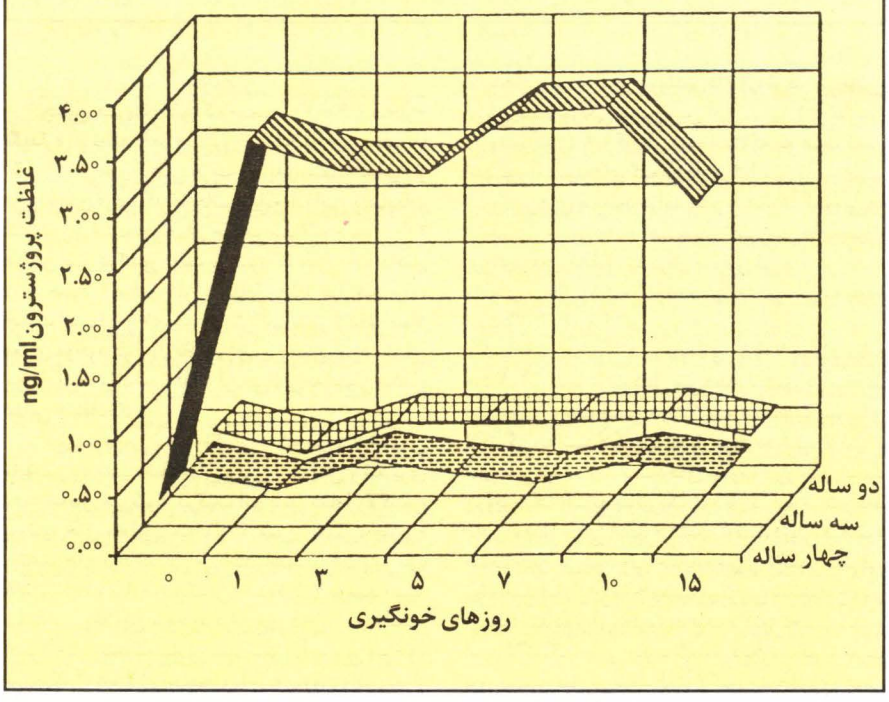


این پدیده سبب کاهش فرکانس و دامنه پالسهای ترشحی LH می‌شود. از آنجائی که غده هیپوفیز در قبل از بلوغ آماده جوابدهی به GnRH می‌باشد. بنابراین تزریق GnRH باعث تولید LH-Surge می‌شود که تخمک‌گذاری صورت می‌پذیرد. گیرنده‌های موجود در واژن و سرویکس که محرک ترشح GnRH هستند در شترهای نابالغ هنوز شکل‌نگرفته و با اینکه فعال نیستند ولی این رسپتورها در چهار سالگی فعال شده و با تحریک سرویکس می‌توان از راه ترشح GnRH، رفلکس عصبی - هورمونی شروع ترشحات LH را به کار انداخته و با تأثیر روی فولیکولهای بالغ، باعث تخمک‌گذاری آنها شود.

شکل شماره ۳- مقایسه میانگین غلظت هورمون پروژسترون در شترهای ۲، ۳ و ۴ ساله، قبل و بعد از تحریک سرویکس



شکل شماره ۴- مقایسه میانگین غلظت هورمون پروژسترون در شترهای ۲، ۳ و ۴ ساله، بعد از تحریک سرویکس در طی دو هفته خونگیری.



پاورقی‌ها

1- Follicle stimulating hormone
2- Gonadotropin releasing hormone
3- Human chorionic gonadotropin
4- Luteinizing hormone
5- Pregant mare serum gonadotropin
6- Radioimonoassay

منابع مورد استفاده

1- Agrawal S.P. and Khanna N.D 1991. Serum progesterone levels in female during oestrous cycle. Indian J. of. Ani. Sci. 61(1), 73-79.

2- Chen B. X., Yuen Z. X. and Pan G. W. 1985. Semen induced ovulation in the camel (*Camelus bacterian*). J. Reprod. Fert. 73, 335-339.

3- Crighton D.B., Foster J. P. and Scott A. 1975. Plasma LH and progesterone levels after single or multipe injection of synthetic LH-RH in anoestrous ewes and comparison with levels during the oestrous cycle. J. Reprod. Fert. 44, 121-124.

4- Fernandes B., Madden. S., 1970. Effects of different mating stimuli induction of ovulationin the alpaca. J. Reprot. Fert. 22, 261-267.

5- Khazali. H., Borgaei. M. and Imamjomeh N. 1996. Concenteration of LH in prepubertal camel dromedrius. J. Ani. Sci. (supple july 1996).

6- Rettener. I, Sterenson J. S. and Corah L. R. 1992. Endocrine responses and ovarian changes in insemination dairy heifers after an injection of GnRH agonist 11 to 13 days after estrous. J. Ani. Sci. 70, 503-517.

7- Shalash M. R., Nawito M., 1969. Some reproduction aspect in the female camel. Proceeding 5th Int. Cong. Anim. Reprod. & A. I. Torento 2, 263-267.