

Effet inhibiteur d'extraits aqueux de pulpes de caroube, de citron et d'orange sur la cristallurie de patients lithiasiques

[Inhibitory effect of aqueous extracts for carob, lemon and orange pulp on the crystalluria of lithiasic patients]

Younes AASSEM¹, Mohamed BOUHA², Rachid BOUHADI², Mustapha EL BIR², Ahmed GAMOUH¹, and Mohamed MBARKI²

¹Laboratoire de Spectro-Chimie Appliquée et Environnement (LSCAE), Département de Chimie et Environnement, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultane Moulay Slimane, Beni Mellal, Morocco

²Laboratoire des Procédés Chimiques et Matériaux Appliquée (LPCMA), Département de Chimie et Environnement, Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultane Moulay Slimane, Beni Mellal, Morocco

Copyright © 2019 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the *Creative Commons Attribution License*, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: Urolithiasis is defined as the result of abnormal development of the normal constituents of urine within the urinary tract. For a long time, it was called stone sickness, from the Greek "lithos" which means stone. Calcium-calcium lithiasis formed from calcium (Ca) and oxalate (Ox) are by far the most common.

The present work is devoted to the study of the inhibitory effect of crystalluria, which may be present in aqueous extracts of fruit byproducts such as carob, lemon and orange pulp. The objective is that the valorization of its agrifood by-products may be related to the antilithiasic effect of their aqueous extracts. Urine samples from human patients were collected in the Regional Hospital Center of the Beni Mellal-Khénifra area in Morocco. The identification of crystalluria and the enumeration of the identified crystals was carried out by polarizing light optical microscope (PLOM). Solutions of aqueous extracts of the pulps of the three fruits were prepared at different concentrations to evaluate the count, on the PLOM, of calcium oxalate crystals formed.

The pulps of the three by-products (carob, lemon and orange) have an inhibitory effect for the formation of crystals, especially in the case of lemon. According to the obtained results, it is found that at the 0.25 g / l concentration of the aqueous extract, for each of the three types of carob, lemon and orange pulp, around 50% of the number of the calcium oxalate disappears. In addition, it is found that for the aqueous extract of carob pulp at the three concentrations 0.25, 0.125 and 0.0625 g / l, comparing the results on the aqueous solution of calcium oxalate and the urine of the patient lithiasic, we note that the inhibitory effect is not clear. However, the two extracts of lemon and orange pulps have an inhibitory effect on crystalluria for the three concentrations of the extracts.

KEYWORDS: antilithiasic effect, calcium oxalate, crystalluria, by-products, carob, lemon, orange, light microscopy.

RESUME: La lithiase urinaire est définie comme le résultat d'un développement anormal des constituants normaux de l'urine à l'intérieur du tractus urinaire. Pendant longtemps, elle a été appelée maladie de la pierre, du grec « lithos » qui signifie la pierre. Les lithiases oxalo-calciques formées à partir du calcium (Ca) et d'oxalate (Ox) sont de loin les plus fréquentes.

Le présent travail est consacré à l'étude l'effet inhibiteur, de la cristallurie, que peuvent présenter des extraits aqueux de sous-produits de fruits tels que les pulpes de caroube et de citron et d'orange. L'objectif consiste au fait que la valorisation de ses sous-produits agroalimentaires puisse être liée à l'effet antilithiasique de leurs extraits aqueux. Les échantillons d'urines de patients humains ont été collectés dans le Centre Hospitalier Régional de la région de Béni Mellal-Khénifra au Maroc. L'identification de la cristallurie et le dénombrement des cristaux identifiés a été réalisée par microscope optique à lumière

polarisée (MOLP). Des solutions d'extraits aqueux des pulpes des trois fruits ont été préparées à différentes concentrations permettant d'évaluer le dénombrement, par la MOLP, des cristaux d'oxalate de calcium formés.

Les pulpes des trois sous-produits (caroube, citron et l'orange) ont un effet inhibiteur pour la formation des cristaux, notamment dans le cas du citron. D'après les résultats obtenus on constate qu'à la concentration de 0,25g /l de l'extrait aqueux, pour chacun des trois types pulpes : de caroube, de citron et d'orange, environs 50% du nombre des cristaux de l'oxalate de calcium disparaît. En plus, on constate que pour l'extrait aqueux des pulpes de caroube aux trois concentrations 0,25, 0,125 et 0,0625 g/l, en comparant les résultats sur la solution aqueuse d'oxalate de calcium et l'urine du patient lithiasique, on remarque que l'effet inhibiteur est non net. Cependant, les deux extraits des pulpes de citron et orange présentent un effet inhibiteur de la cristallurie, pour les trois concentrations des extraits.

MOTS-CLEFS: effet antilithiasique, oxalate de calcium, cristallurie, sous-produits, caroube, citron, orange, microscopie optique.

1 INTRODUCTION

Le développement durable interpelle aussi bien les chercheurs que les décideurs à œuvrer en partenariat dans le but de la valorisation de produits locaux tels que la pulpe d'agrumes et de caroube. Le Maroc étant un producteur traditionnel des plantes aromatiques et médicinales reste l'un des principaux fournisseurs à l'échelle mondiale, de produits et sous-produits de telles plantes. En fait, les agrumes et caroube sont une partie importante de l'activité agricole de la région de Beni Mellal-Khénifra au Maroc.

L'urolithiase serait de prévalence ascendante dans le monde, en particulier dans les pays industrialisés et dans ceux en développement. De nombreuses techniques d'analyse ont été publiées, reposant parfois sur l'utilisation d'équipements inaccessibles en pratique clinique courante, comme le microscope électronique à balayage ou les compteurs de particules. Le premier calcul vésical connu remonte aux environs de 4800 ans avant Jésus-Christ et a été découvert dans les restes d'une momie en haute Egypte [1]. La formation de calculs urinaires est un processus connu sous le nom d'urolithiase. En augmentant les preuves suggèrent que l'incidence et la prévalence des calculs rénaux sont à la hausse globalement, alors que la pathogenèse de cette maladie et les méthodes préventives restent à élucider [2].

La cristallurie est un marqueur des urines qui s'observe en urines normales ou pathologiques. Cependant, la nature et les caractéristiques de la cristallurie sont souvent révélatrices d'anomalies biochimiques ou de pathologies qui peuvent être aisément dépistées ou surveillées par analyse. L'augmentation des niveaux d'excrétion de phosphore et de calcium ainsi que le stress dû à l'oxalate créent un environnement propice à la formation de calculs en générant des cristaux de phosphate de calcium. [3].

La grande diversité des espèces chimiques et cristallines dans les urines et dans les calculs (plus de 90 espèces chimiques identifiées) rend la compréhension des mécanismes de la lithogénèse plus complexe [4]. Ainsi, l'objectif du présent travail est de valoriser les sous-produits d'agrumes tout en étudiant l'effet antilithiasique éventuel de ses extraits aqueux sur la cristallisation d'oxalate de calcium (OxCa) et urate en milieu aqueux et en cristallurie. 100 échantillons d'urine humaine et des extraits aqueux de pulpes d'agrumes comme le citron, l'orange et de la caroube ont été recueillis dans la zone géographique de Beni Mellal. Tous les échantillons ont été conservés à 4 °C. Les échantillons de pulpes ont été macérés à froid pendant 48 heures. L'équation de la réaction mise en jeu dans ce travail est la suivante :



La lithiase urinaire est le résultat d'un déséquilibre entre des substances cristallisables dites promoteurs, et des substances protectrices de la cristallisation désignées sous le terme d'inhibiteurs [6]. La prévention efficace de la formation récurrente de calculs dépend de plusieurs facteurs tels que les épisodes et calculs chirurgicaux actuels et précédents, la composition des calculs, les antécédents médicaux, les habitudes alimentaires et d'alcool, le mode de vie et le traitement pharmacologique en cours [6].

L'urine est dotée des inhibiteurs de cristallisation qui ont l'effet d'empêcher la formation d'agrégats cristallins dans le tubule rénal, où les urines sont spontanément sursaturées en oxalate et en phosphate de calcium. Les inhibiteurs peuvent être classés en deux groupes selon leur mécanisme d'action [7], [8]:

Les uns, qui sont des ions mono- ou polyatomiques de faible poids moléculaire, tels que les ions citrate ou magnésium, agissent en complexant, respectivement, les ions calcium et oxalate. Ils réduisent la quantité d'ions calcium et oxalate libres

susceptibles de s'unir pour former des cristaux. Ces inhibiteurs agissent à des concentrations molaires du même ordre que celui du calcium.

Les autres, qui constituent les inhibiteurs proprement dits, agissent principalement en bloquant les sites de croissance des cristaux par adsorption à leur surface, se comportant ainsi comme de véritables "poisons des cristaux". Ils comprennent des ions de faible poids moléculaire comme les pyrophosphates et diverses macromolécules filtrées par les glomérules ou produites par les cellules de l'épithélium tubulaire. Ils sont actifs à des concentrations beaucoup plus faibles que les précédents car les sites de croissance représentent à peine 1% de la surface des cristaux [9] :

Tableau 1. Espèces chimiques inhibitrices d'oxalate de calcium et/ou du phosphate de calcium
Avec N: Nucléation, C: Croissance et A: Agrégation

	Oxalate de calcium			Phosphate de calcium		
	N	C	A	N	C	A
Citrate	+++	+	+++	++	+	+
Pyrophosphate	+	+	++	+++	++	+
Magnésium	++	+	-	+	+	-
Sulfate de chondroïtine	-	++	++	-	+	+
Sulfate d'héparane	-	+++	++	-	-	++
Protéine de Tamm-Horsfal (Non polymérisée)	-	+	+++	-	-	-
UPTFI (ex Crystal Matrix Prottien)	-	+	+++	-	-	-
Bikunine (ex Uronic Acid-rich Protein ou UAP)	-	++	-	-	-	-
Uropontine	-	++	-	-	++	-

L'identification d'espèces chimiques particulières telles que la struvite, la cystine, la dihydroxyadénine ou la xanthine a une valeur considérable pour le diagnostic des calculs d'infection et de maladies génétiques telles que la cystique et la dihydroxyadéninurie, qui nécessitent un traitement spécifique [10]. Par exemple, le traitement par Cystone, qui est un médicament exclusif à base de polyherbal ayurvédique approuvé, qui offre une protection contre l'hyperoxalurie liée au stress oxydatif et contre le dépôt de cristaux d'oxalate de calcium en améliorant le statut antioxydant et la diurèse des tissus rénaux [11], [12].

Des travaux antérieurs ont montré que des extraits de quelques plantes médicinales ont un effet inhibiteur de l'agrégation et la croissance cristalline : la plante *Cynodon dactylon* L. possède un effet inhibiteur de l'agrégation cristalline avec un taux de 60%, alors que l'extrait de la plante *Triticum aestivum* L. possède un effet inhibiteur avec un taux de 80% [13]. Le présent travail a pour objectif aussi bien la valorisation de la méthode de l'examen de la cristallurie par MOLP que celle de trois sous-produits agroalimentaires qui sont les pulpes de caroube, de citron et orange en utilisant leurs extraits aqueux comme éventuels inhibiteurs naturels. En plus le présent travail intègre les résultats de la recherche et du progrès en urologie [14].

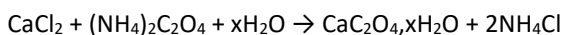
2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le présent travail a été consacré à l'effet des solutions d'extraits des pulpes de citron, caroube et orange produites dans la région de Beni Mellal-Khenifra au Maroc sur les cristalluries dans des urines de patients lithiasiques. Pour cela nous avons procédé en deux étapes.

2.1 PREMIÈRE ÉTAPE

Préparation des solutions d'oxalate :

- ✓ Dans l'erlen de 200ml on fait former une quantité de $4 \cdot 10^{-4}$ g de CaC_2O_4 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol) dans 50 ml d'eau distillée :
 $\text{CaCl}_2 + (\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \rightarrow \text{CaC}_2\text{O}_4 + 2\text{NH}_4\text{Cl}$
- ✓ Dans l'eau distillée à 37°C (température proche de celle du rein) on aura :



Si $x=1$: Oxalate de Calcium Monohydraté (OCM : Whewellite) : plus fréquent en calculs urinaires

Si $x=2$: Oxalate de Calcium Dihydraté (OCD : Weddellite) : plus fréquent en cristallurie

Si $x=3$: Oxalate de Calcium Trihydraté (OCT) : instable, d'où sa rareté.

✓ Donc dans l'erenmeyer on prépare une solution saturée d'oxalate de calcium. Pour cela, on y mélange :

$3 \cdot 10^{-4}$ g de CaCl_2

$4 \cdot 10^{-4}$ g de $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$

- On y met un barreau magnétique pour agitation
- On y fixe un thermomètre pour contrôler la température à 37°C
- On fixe le pH à une valeur du pH urinaire ordinaire (entre 6,5 et 7,5)
- Une fois la température à 37°C, on laisse la solution s'agiter 2h
- En gardant l'agitation, on prend par micropipette une prise au milieu de la solution et on la dépose entre lame et lamelle pour observation sous microscope optique à lumière polarisée.
- Préparation de solutions d'extraits aqueux de la pulpe de caroube à des différentes concentrations.

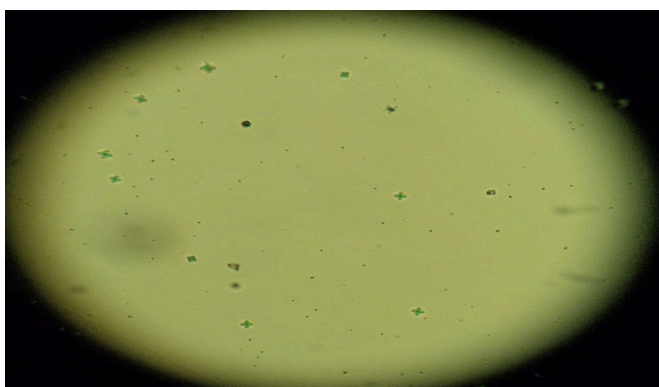


Fig. 1. Micrographies de cristallurie de whewellite et weddellite

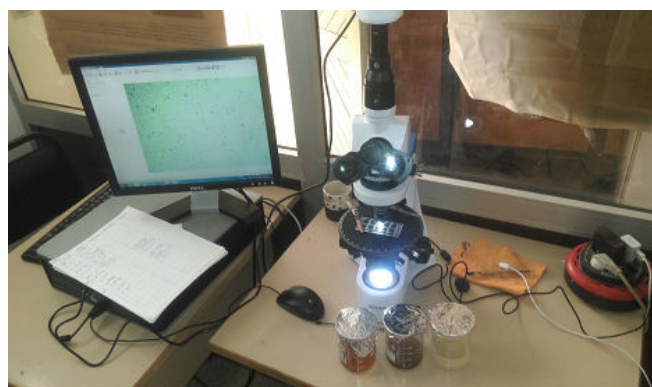


Fig. 2. Microscope optique à lumière polarisée (x400)

Après avoir effectué des essais d'observation de l'éventuel effet inhibiteur d'extraits des pulpes à des concentrations croissantes sur la cristallisation de l'oxalate de calcium on détermine la concentration minimale de l'extrait assurant la disparition de presque 50% des cristaux. L'examen de la cristallurie a été réalisé par microscopie optique à polarisation sur une lame de type cellule de Malassez.

2.2 DEUXIÈME ÉTAPE

Les échantillons de l'urine ont été collectés auprès de 50 patients dont 30 hommes et 20 femmes, avec une marge d'âge entre 6 et 67 ans. Finalement, les solutions d'oxalate et celles des extraits de pulpes ont été mélangées puis observées par MOLP.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 RÉSULTATS

3.1.1 PREMIÈRE PARTIE

Les résultats obtenus, en termes de pourcentage de disparition du nombre des cristaux d'oxalate de calcium en présence de l'extrait aqueux de caroube, citron et orange, sont rapportés par le tableau II et aussi par la figure 3 suivants :

Tableau 2. Pourcentage de disparition du nombre des cristaux d'oxalate de calcium, en solution aqueuse, en présence de l'extrait aqueux de caroube, citron et orange.

Concentration de l'extrait aqueux (g/l)	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
Caroube	32	43	56	64	75
Citron	32	42	49	67	78
Orange	30	38	45	65	77

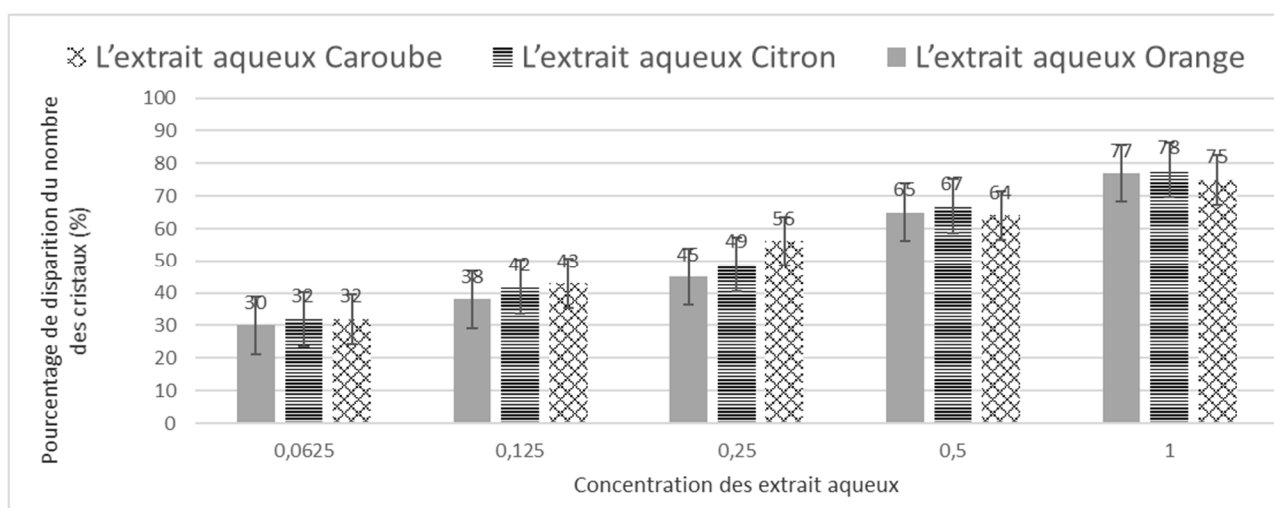


Fig. 3. Evolution du pourcentage de disparition des cristaux d'oxalate de calcium selon la concentration de l'extrait aqueux des pulpes de caroube, citron et orange

3.1.2 DEUXIÈME PARTIE

La répartition de l'âge des 50 patients selon leur sexe est telle que 20 patients sont des femmes avec une marge d'âge entre 15 ans et 45 ans et que 30 patients sont des hommes avec une marge d'âge entre 5 ans et 70 ans.

Après des essais effectués sur l'urine de ces patients en présence d'extraits des pulpes de caroube, de citron et d'orange les résultats obtenus sont donnés par le tableau III ci-après. Pour une question de commodité dans ce tableau seules trois concentrations des extraits aqueux ont été considérées.

Les résultats obtenus, en termes de pourcentage de disparition du nombre des cristaux dans les urines des patients lithiasiques en présence de l'extrait aqueux de caroube, citron et orange, sont rapportés par le tableau III et par la figure 4 ci-après :

Tableau 3. Pourcentage de disparition du nombre des cristaux chez des patients lithiasiques, dans l'urine des patients lithiasiques, en présence de l'extrait aqueux de caroube, citron et orange

Concentration de l'extrait aqueux (g/l)	0,0625	0,125	0,25
Caroube	35	48	52
Citron	42	58	66
Orange	40	55	62

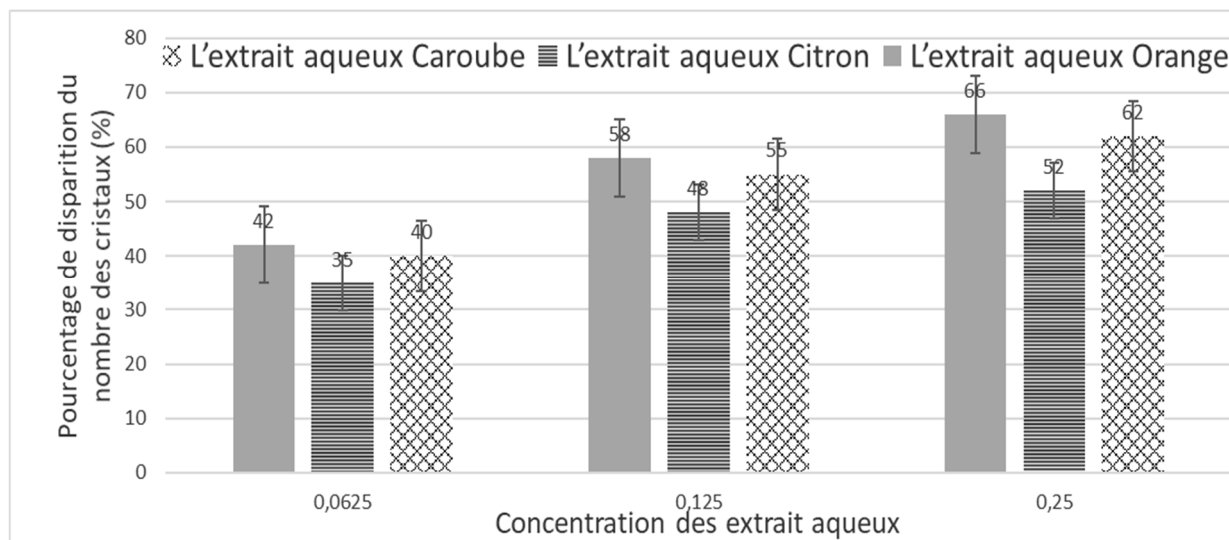


Fig. 4. Evolution du pourcentage de disparition des cristaux dans des urine des patients lithiasique, selon la concentration de l'extrait aqueux des pulpes de caroube, citron et orange.

3.2 DISCUSSION

D'après les résultats de la première partie de notre travail on remarque que :

- Quand l'extrait des pulpes des trois sous-produits étudiés caroube, citron, et orange est plus concentrées, le pourcentage des cristaux disparus augmente.
- La différence au niveau des pourcentages de disparition des cristaux pour les trois sous-produits est presque négligeable, avec une très légère priorité de disparition des cristaux pour le citron, puis l'orange.
- Disparition de plus de 50% des cristaux à partir de la concentration 0,25 g/l.

La conclusion qu'on peut tirer de ces remarques est que la pulpe de ces trois sous-produits (caroube, citron et orange) aurait un effet inhibiteur pour la formation des cristaux, notamment dans le cas du citron.

D'après les résultats de la deuxième partie, les essais sur les urines des patients lithiasique :

- En augmentant la concentration des solutions des pulpe des trois sous-produits, on observe une augmentation du pourcentage des cristaux disparus.
- Il n'y a pas de grande différence en pourcentage de disparition des cristaux entre les trois sous-produits.

En comparant l'évolution du pourcentage de disparition des cristaux dans des urine des patients lithiasiques et des solutions oxalate, selon la concentration de l'extrait aqueux des pulpes de caroube, citron et orange (**Figure 5**) on peut formuler les constatations suivantes :

- A la concentration de 0,25g /l de l'extrait aqueux, pour chacun des trois types pulpes : de caroube, de citron et d'orange, environs 50% du nombre des cristaux de l'oxalate de calcium disparaît.
- Selon les résultats sur la solution aqueuse d'oxalate de calcium et l'urine du patient lithiasique, l'extrait aqueux des pulpes de caroube aux trois concentrations 0,25, 0,125 et 0,0625 g/l, ne présente pas d'effet inhibiteur net.

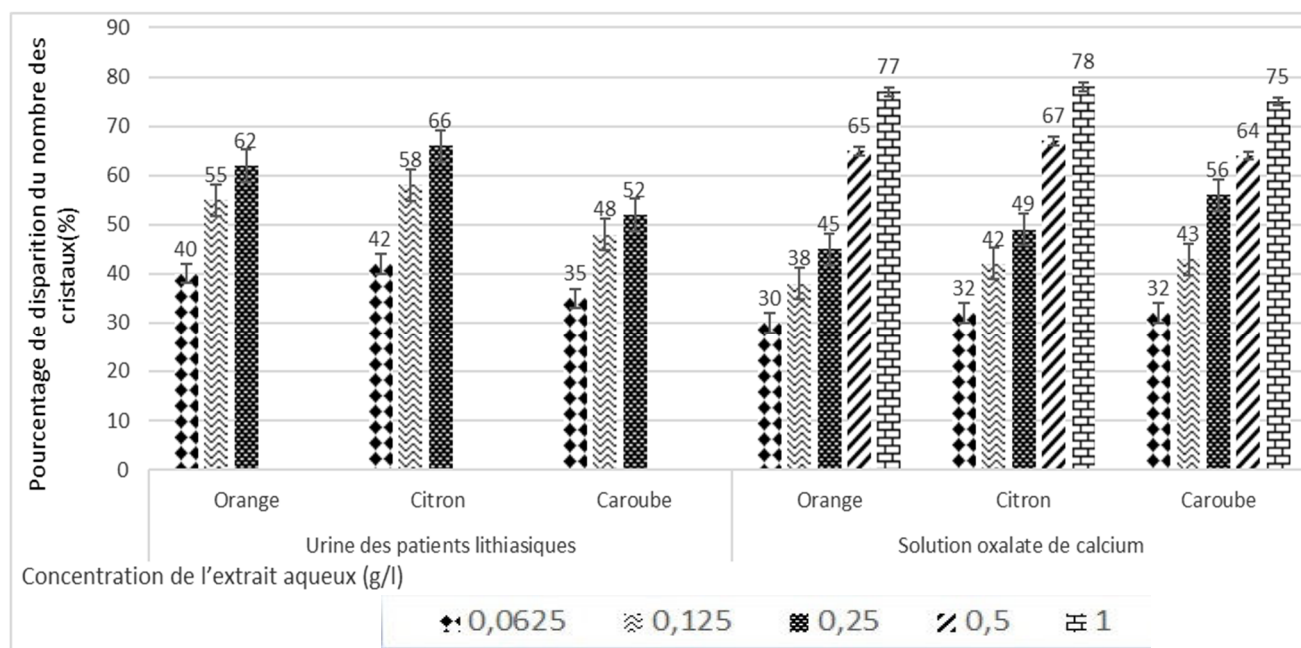


Fig. 5. Evolution du pourcentage de disparition des cristaux dans des urine des patients lithiasiques et des solutions oxalate, selon la concentration de l'extrait aqueux des pulpes de caroube, citron et orange

4 CONCLUSION

D'après les résultats du présent travail, les extraits de caroube, citron et d'orange présenteraient un effet inhibiteur, de la cristallurie. Ainsi, des applications de valorisation de tels sous-produits agroalimentaires sont à exploiter.

La consommation de certains aliments, de certaines boissons ou le simple défaut d'apport hydrique peut provoquer la sursaturation de l'urine par certaines substances chimiques ou modifier son pH, aussi bien chez un sujet non lithiasique que chez des personnes à risque lithogénique [15], [16]. Des données épidémiologiques montrent que plus de 80 % des calculs sont composés principalement d'oxalate de calcium (CaOx) et sont associés dans la plupart des cas à des désordres nutritionnels [17], [18].

Dans la médecine, l'opération chirurgicale, lithotripsie et l'utilisation locale de lasers à haute puissance sont des options de traitement courantes pour l'élimination des calculs [19]. D'autre part, un certain nombre de plantes seraient efficaces pour corriger la formation des calculs urinaires [20]. En fait, il y a utilisation de l'extrait de plante entière de *Biophytum sensitivum* dans la médecine populaire contre l'urolithiase [21].

REFERENCES

- [1] M. Daudon, Epidémiologie actuelle de la lithiase rénale en France. *Annales d'urologie* 2005 ;39 :209-31.
- [2] B. Hannache, D. Bazin, A. Boutefnouchet, M. Daudon, Effet des extraits de plantes médicinales sur la dissolution des calculs rénaux de cystine in vitro : étude à l'échelle mésoscopique, *Progrès en urologie* 2012 : 22 ; 577 - 582.
- [3] F.C. Torricelli, E. Mazzucchi, A. Danilovic, R.F. Coelho, M. Srougi. Surgical management of bladder stones: literature review. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2012 :40 -3; 227–233.
- [4] N. Wang, D. Zhang, Y.T. Zhang, W. Xu, Y.F. Xiu. *Journal of Ethnopharmacology*. 1 March 2018: Pages 80-89.
- [5] M. Daudon, O. Traxer, E. Lechevallier, C. Saussine. *Epidémiologie des lithiases urinaires. Prog Urol* 2008 : 18 ; 815-27.
- [6] C. Hennequin et al. Inhibiteurs de la lithogénèse. *Option/Bio supplément du N194*, Octobre 1997.
- [7] H. G. Tiselius, M. Daudon, T. Kay, C. Seitz. *Metabolic Work-up of Patients with Urolithiasis: Indications and Diagnostic Algorithm*. February 2017: 62-71.
- [8] M. Daudon, F. Cohen-Solal, P. Jungers. Mécanismes de la lithogénèse et de la cristallurie, Article reçu le 24 Mai 2000.
- [9] M. Daudon, C. Hennequin, C. Bader, P. Jungers, B. Lacour, T. Druke. Inhibiteurs de cristallisation dans l'urine. *Actualités Néphrologiques – Jean Hamburger, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1994 : pp 165-220.*
- [10] D. Bazin, M. Daudon, P. Chevallier, S. Rouzière, E. Elkaim, D. Thiaudière, B. Fayard, E. Foy, P.A. Albouy, G. André, A. Cousson, G. Matzen, E. Veron. Un rayon de soleil pour les calculs. *Vol. Spécial Recherche 2006/2007 : 134-63.*

- [11] M. Daudon, V. Frochet, D. Bazin, P. Jungers. L'étude de la cristallurie améliorée diagnostic et la prise en charge thérapeutique de la lithiase rénale. *C. R. Chimie* 19,2016: 1514 ;1526.
- [12] N. Partovi, M.R. Ebadzadeh, S.J. Fatemi, M. Khaksari. Antilithiatic effect of aqueous and ethanolic extracts of cactus prickly pear in chemically induced urolithiasis in rats. *Toxin Rev.*2018 :37 -2; 166–170.
- [13] Kiran S. Bodakhe, Kamta P. Namdeo, Kartik C. Patra, Lalit Machwal, Surendra K. Pareta. A polyherbal formulation attenuates hyperoxaluria-induced oxidative stress and prevents subsequent deposition of calcium oxalate crystals and renal cell injury in rat kidneys. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2013, 11(5): 0466–0471.
- [14] B. Hannache, D. Bazin, A. Boutefnouchet, M. Daudon, Effet des extraits de plantes médicinales sur la dissolution des calculs rénaux de cystine in vitro : étude à l'échelle mésoscopique, *Progrès en urologie* 2012 : 22 ; 577 - 582.
- [15] M. Sekkoum Khaled, *Lithiase Urinaire et Plantes Médicinales*, Book · June 2012.
- [16] C. Tcheka, M. Mbarki, Apport de l'étude de la cristallurie et du dosage chimique a la recherche des paramètres de risque de la cristallisation oxalocalcique urinaire, *J Maroc Urol* 2012 : 27-28 ;25-32.
- [17] J. Yu, H. Tang, B. Cheng. Influence of PSSS additive and temperature on morphology and phase structures of calcium oxalate. *J Colloid Interface Sci* 2005: 288; 407-11.
- [18] M. Daudon. Cinq calculs - cinq photos - cinq diagnostics - cinq astuces, *Progrès en Urologie - FMC*, 2012 : 22 ; F87-F93.
- [19] A. Kamoun, A. Zghal, M. Daudon, S. Ben Ammar, L. Zerelli, J. Abdelmoula, B. Chaouachi, T. Houissa, C. Belkahia, R. Lakhoua, M. Daudon. La lithiase urinaire de l'enfant : contributions de l'anamnèse, de l'exploration biologique et de l'analyse physique des calculs au diagnostic étiologique, *Archives de Péd.* 1997 : 4 ; 629 – 638.
- [20] F. P. Begun, C.E. Knoll, M. Gottlieb, R.K. Lawson. Chronic effects of focused electrohydraulic shock-waves on renal function and hypertension. *J Urol* 1991; 145:635–9.
- [21] T. Mukharjee, N. Bhalla, G.S. Aulakh, H.C. Jain. Herbal drugs for urinary stones-literature appraisal. *Indian Drugs* 1984: 21:224–8.
- [22] Anil T. Pawar, Niraj S. Vyawahare. Protective effect of standardized extract of *Biophytum sensitivum* against calcium oxalate urolithiasis in rats. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* 2015; 53: 161–172.