

تأثير مستخلص نبات المسواك في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرضى

التهاب اللثة تأثير مستخلص نبات

عباس عبود الدليمي, زينب حسين العزاوي , سعاد خيرى الخشالي

تأثير مستخلص نبات المسواك في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرضى التهاب اللثة

عباس عبود الدليمي, زينب حسين العزاوي , سعاد خيرى الخشالي

كلية التربية / الرازي ، جامعة ديالى،كلية التربية / الرازي ، جامعة ديالى / كلية التربية / الرازي ، جامعة ديالى

Receiving Date: 12-05-2010 - Accept Date: 20-06-2010

الخلاصة

أجريت الدراسة لمعرفة تأثير المستخلص المائي الحار لنبات المسواك على المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرضى التهاب اللثة مقارنة مع تأثير بعض المضادات الحيوية عليها. جمعت (50) عينة من المرضى الذين يعانون من التهاب اللثة من المركز التخصصي للأسنان في محافظة ديالى للمدة من 2009/2/1 لغاية 2009/6/1 . اعتمد تشخيص البكتريا المدروسة على الصفات الزرعية والفحص المجهرى والنمو على الأوساط التفرقية والاختبارات الكيموحيوية القياسية ، استخدمت طريقة الانتشار بالأقراص لاختبار فحص الحساسية الدوائية واختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص بتركيز مختلفة (20% ، 30% ، 40% ، 50%). تم الحصول على 15 (30%) عزلة من المكورات العنقودية الذهبية بواقع 4 عزلات من الذكور (26.66%) و 11 عزلة من الإناث (73.33%) وكانت أكثر الفئات العمرية إصابة هي (50-59) سنة بنسبة (33.3%). لا يوجد فرق معنوي بين نسبة الإصابة بالعزلات البكتيرية واستخدام المسواك (P= 0.37) ، و حدوث نزف في اللثة (P= 0.36) ، والتدخين (P= 0.37). أظهر مستخلص المسواك بتركيز (50 %) تأثير أكبر من التراكيز الأخرى إذ كانت منطقة التثبيط (9.86) ملم بفروقات عالية المعنوية عند مستوى احتمالية (P< 0.05) ، فضلا عن وجود فروقات معنوية بين تأثير المسواك بتركيز (30% ، 40% ، 50%) وبين حساسية العزلات لمضادى الفانكوميسين والكاربنسلين . وتبين انه كلما زاد تركيز المستخلص المائي لنبات المسواك كان التأثير أكثر على بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من التهاب اللثة بالمقارنة مع بعض أنواع المضادات الحيوية .

تأثير مستخلص نبات المسواك في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرضى التهاب اللثة تأثير مستخلص نبات

المقدمة

يستوطن فم الإنسان منذ الولادة أنواع وأعداد كبيرة من الميكروبات المفيدة والضارة لصحة الفم والاسنان على حد سواء. وتساهم عوامل متعددة في بيئة الفم على تكاثر وتنوع الميكروبات ومنها بالأخص مدى انتظام الأسنان الطبيعية ونظافة وصيانة أطقم الأسنان الصناعية، ومقدار سلامة وحيوية أنسجة اللثة والأربطة حول السن ، فضلاً عن عامل هام يتعلق بنوعية الأغذية [1] .

يقوم اللعاب في الفم بترسيب مركبات بروتينية- سكرية تشكل طبقات رقيقة وشفافة تسمى الطهاوة Pellicle على سطوح الأسنان (المينا Enamels) مما يساعد ميكروبات الفم على الالتصاق بهذه الطبقات ومن ثم التكاثر والتراكم بكميات كبيرة وبشكل طبقات عضوية رقيقة تعرف باسم اللويحات السنية الميكروبية على سطوح الأسنان ، وفوق وتحت حافة اللثة. ومن المؤكد علمياً انه إذا لم يتم تنظيف الأسنان جيداً او بصورة دائمية يوميا وإذا استمر تراكم اللويحات الميكروبية فانه يؤدي إلى التهاب اللثة Gingivitis والذي يتميز باحمرار وانتفاخ اللثة وسهولة نزفها وقد يتطور الى مرض التهاب حول السن / الانسجة الداعمة السنية الا انه يمكن إزالة اللويحة الميكروبية وتأمين وقاية من أمراض الأنسجة المحيطة بالسن فقط بعناية يومية جيدة وعناية مهنية منتظمة [2,3] .

تستخدم شعوب عديدة ومنذ عدة قرون أجزاء بعض النباتات (ساقاً او جذراً) لتصنيع عيدان قادرة على تنظيف الأسنان تسمى عيدان المضغ Chewing sticks. ومنذ قرون عديدة استخدم البابليون والإغريق والرومان وقدماء المصريين والمسلمون وأنحاء متفرقة من أفريقيا واسيا وبالأخص منطقة الشرق الأوسط نبات المسواك Miswak وهو عبارة عن ساق او جذر شجيرة صغيرة تدعى الاراك Arrak والاسم العلمي Salvadora persica لأغراض صحية واجتماعية ودينية [4] . كما إن استعمال المسواك يؤدي إلى انخفاض معدل الحاجة إلى معالجة أمراض الأنسجة المحيطة بالسن، وإن لعيدان المسواك خواص ميكانيكية وكيميائية مضادة للويحة الميكروبية وتآكل الأسنان وانحسار نزيف اللثة ، وتم استخدام خلاصة المسواك في معاجين الأسنان والمضامض الفموية بهدف السيطرة على اللويحة الميكروبية وصحة الأنسجة المحيطة بالسن [2 ، 5] .

وان كان العلم الحديث قد اثبت فعالية وأهمية نبات المسواك في العناية بالفم فقد وصف رسولنا الكريم محمد (صلى الله عليه وسلم) فعاليته قبل تطور العلم الحديث فقال (صلى الله عليه وسلم) :- " لولا إن اشق على أمتي لإمرتهم

تأثير مستخلص نبات المسواك في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرضى
التهاب اللثة تأثير مستخلص نبات

بالمسواك في كل صلاة " وأثبتت الدراسات علميا إن للمسواك تأثير كبير على وقف نمو بكتريا الفم لاحتوائه على مواد فعالة ضد البكتريا منها مادة الكبريت ومادة تري ميثيل أمين Tri-methyl-amin التي تعمل على خفض pH للفم وبالتالي منع نمو البكتريا فضلا عن احتوائه على فيتامين (ج) ومادة السيترول وهاتان المادتان لهما دور في حماية اللثة من الالتهابات ، أما الكلوريد والفلوريد والسليكا فهذه المواد معروفة بأنها تزيد من بياض الأسنان [6] . فضلا عن هذه المركبات فقد اظهر التحليل الكيميائي للمستخلص باحتوائه على مركبات الكبريت والايثوثايوسيانييد Isothiocyanate المسؤولة عن الفعالية التثبيطية للمستخلص تجاه البكتريا ، ومادة تري ميثيل أمين تقلل من الالتصاق بالسطوح وتزيل الصفائح البكتيرية المتراكمة ، ومركبات Benzyl isothiocyanate , Tannins, Tannic acid لها دور كبير في الفعالية التثبيطية ضد الأحياء المجهرية وفي معالجة التهابات اللثة [7] .

ان الفعالية التثبيطية لمستخلص المسواك ضد *Escherichia coli* , *Enterococcus feacalis* , *Pseudomonus aeruginosa* قد يعود سببه الى ما يحتويه المستخلص من مادة النترات (No_3^-) الفعالة ضد هذه الأنواع البكتيرية ، كما يعمل على تثبيط عملية الأكسدة في كل من *Pseudomonus aeruginosa* , *Staphylococcus aureus* [8] . يستوطن الفم العديد من أنواع البكتريا بشكل طبيعي الا أنها قد تنتهز الفرصة لتتحول الى بكتريا ممرضة مسببة التهابات اللثة او تجتمع لتكون الصفيحة الميكروبية (Microbial Plaque) ومنها بكتريا *S. aureus* ومصدرها الإنسان بما يحمله على يديه وجلده من بثرات ودمامل تسببها هذه البكتريا كما ان تجاوز الفم تعد بؤرة لها [9] . تعد بكتريا *S. aureus* واسعة الانتشار ومن أهم أنواع البكتريا المرضية للإنسان اذ تتواجد بصورة طبيعية على سطح الجلد وفي الأنف والبلعوم والقناة الهضمية والتتاسلية ويمكن عزلها من الأيدي والهواء والأرض والأغذية والألبسة. وتمتاز هذه البكتريا بامتلاكها للعديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من أحداث الاخماج اذ تنتج اليفانات المعوية ولها القابلية على إنتاج أنزيمات مثل (*Danase*, *Gelatinase*, *Hemolysin*, *Lipase*, *Leucocidin*, *B-*) *Lactamase* , وانزيم *Goagolase* والتي تعمل على حماية هذه البكتريا من عملية البلعمة وتعزيز امراضيتها [10] .

وفي السنوات الأخيرة ازداد الاهتمام بدراسة النباتات الطبية ومدى تأثيرها التثبيطي على الأحياء المجهرية وبالأخص البكتريا الشائعة الانتشار ومن هنا جاءت هذه الدراسة لتهدف الى معرفة تأثير مستخلص الماء الحار لنبات المسواك

تأثير مستخلص نبات المسواك في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرضى

التهاب اللثة تأثير مستخلص نبات

وبتراكيز مختلفة على بكتريا S. aureus المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب اللثة ومقارنة تأثير المستخلص مع تأثير المضادات الحيوية المستعملة .

طرائق العمل

جمع العينات وعزل البكتريا

جمعت (50) عينة من المرضى الذين يعانون من التهابات اللثة في المركز التخصصي للأسنان في محافظة ديالى للفترة من 2009/2/1 لغاية 2009/6/1 باستخدام مسحات قطنية معقمة Sterile cotton swabs مرطبة بمحلول الملح الفسلجي. ثم نقلت العينات الى المختبر وزرعت على اطباق حاوية على وسطي lood agar و MacConkey agar بطريقة التخطيط وحضنت الأطباق هوائيا بدرجة حرارة (37) م° لمدة (24) ساعة ثم حفظت بدرجة حرارة 4 م° لحين استخدامها في الاختبارات التشخيصية [10 ، 11] .

تشخيص العزلات البكتيرية :

شخصت العزلات بالاعتماد على الصفات الزرعية للمستعمرات النامية، وعلى الفحص المجهرى لملاحظة شكل وقابلية اصطبغ الخلايا البكتيرية بصبغة كرام كما شخصت المستعمرات على اساس الاختبارات الكيميوحيوية والتي شملت اختبار انزيم الاوكسيديز ، وانزيم التجلط Coagulase ، والانزيم المحلل للمادة النووية DNase، واختبار تخمر المنتول والسكريات ، واختبار تمييع الجيلاتين ، واختزال الاندول [12 ، 13] .

حفظ وادامة العزلات البكتيرية:

تم حفظ العزلات بشكل مؤقت على مائل الوسط المغذي ثم حضنت بدرجة حرارة (37 م°) لمدة (24) ساعة ثم حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° ويتم تجديدها كل أسبوعين ، أما الحفظ الدائم للعزلات فتم بإضافة (15) مل من الكليسرول الى (85) مل من وسط نقيع الدماغ والقلب ، وزع في قناني صغيرة ذات غطاء محكم وعقم بالموصدة وترك

تأثير مستخلص نبات المسواك في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرضى
التهاب اللثة تأثير مستخلص نبات

ليبرد بدرجة حرارة الغرفة ثم لفتح بمستعمرات نقية من البكتريا النامية ، بعدها حفظت القناني في درجة حرارة (- 20) م ° [10 ، 14].

طرائق الاستخلاص (الاستخلاص المائي الحار لنبات المسواك)

جهزت العينات النباتية (المسواك) لعمل المستخلصات المائية من الأسواق المحلية وقد شخصت هذه العينات في معشيب جامعة بغداد / كلية العلوم / قسم علوم الحياة .

طحنت العينة النباتية المعدة للاستخلاص باستخدام طاحونة كهربائية (Waring blender) نوع (Moulinex) واخذ (50) غم من المسواك وأضيف (500) مل ماء مقطر مغلي وضع في الحاضنة الهزازة لمدة (30) دقيقة على حرارة (35) م ° بعدها رشح المزيج بواسطة ثلاث طبقات من قماش الشاش لفصل العوالق الكبيرة ثم اجري الترشيح النهائي باستخدام جهاز الطرد المركزي وبسرعة (300 دورة / دقيقة) وعد منه مستخلص ذو تركيز كامل القوة ومن ثم تم تحضير التراكيز (20 ، 30 ، 40 ، 50) من تخفيف التركيز الكامل [15] . تم التأكد من عدم تلوث المستخلص وذلك بزرع (0.1) مل منه على وسط الاكار المغذي وحضن لمدة (42) ساعة بدرجة حرارة (37) م ° [14] .

اختبار فحص الحساسية الدوائية :

اجري الاختبار بالاعتماد على الطريقة المعروف لـ Bauer وجماعته (1966) باستخدام ثلاثة مضادات وهي VA () Carbencillin (PY) , Pipracillin (PRL) , Vancomycin .

استخدام الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات المسواك :

استخدمت طريقة النشر اذ نقل (0.1) مل من المعلق البكتيري بعمر (24) ساعة وقورنت بمحلول مكفرلاند القياسي ونشر على وسط مولر هنتون اكار . عملت بعدها حفر بقطر (5) ملم على سطح الوسط المزروع باستخدام الثاقب الفليني المعقم نقلت بعدها تراكيز مختلفة (20% ، 30% ، 40% ، 50%) بمقدار (50) مايكروليتر في كل حفرة مع عمل حفرة سيطرة حاوية على ماء مقطر معقم حددت فعالية المستخلص بقياس منطقة التثبيط المتكونة حول الحفرة مقدرة بالملم بعد مدة حضانة (48) ساعة وبدرجة (37) م ° وكررت العملية (3) مرات لكل عزلة [9] .

تأثير مستخلص نبات المسواك في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرضى

التهاب اللثة تأثير مستخلص نبات

النتائج والمناقشة :

خلال الدراسة الحالية تم الحصول على 15 (30 %) عزلة من بكتريا S. aureus من مجموع (50) عينة من المرضى الذين يعانون من التهابات اللثة وهذا يتفق مع دراسة [16]، إذ وجدنا ان هذه البكتريا هي الأكثر شيوعاً من بين الممرضات الفموية بنسبة إصابة (10.63 %) وان احد أسباب زيادة نسبة الإصابة بهذه البكتريا يعود لكونها متواجدة بكثرة ضمن النبيت الطبيعي للجلد وكذلك الفم والمجرى التنفسي وعندما تنتهي لها الفرصة المناسبة تصبح انتهازية ممرضة مسببة التقيحات والالتهابات في هذه المنطقة [10]. أظهرت النتائج عدم وجود فرق معنوي بين نسبة الإصابة بالعزلات البكتيرية وجنس المريض (P= 0.37) ، وعمر المريض (P= 0.33) ، واستخدام المسواك (P= 0.37) ، وحدوث نزف في اللثة (P= 0.36) ، والتدخين (P= 0.35) كما هو مبين في الجداول أدناه .

جدول (1) العلاقة بين نسبة الإصابة بالعزلات البكتيرية وجنس المريض

الجنس	العزلات البكتيرية	P Value
الذكور	4 (26.66 %)	0.37
الإناث	11 (73.33 %)	
المجموع	15 (100 %)	

جدول (2) العلاقة بين نسبة الإصابة بالعزلات البكتيرية وعمر المريض

الفئات العمرية	29 سنة فأقل	39-30	49-40	59-50	60 فأكثر	P Value
العزلات	20 %	6.66 %	20 %	33.3 %	20 %	0.33
المجموع	3	1	3	5	3	15

جدول (3) العلاقة بين نسبة الإصابة بالعزلات وبين استخدام المسواك ، والتدخين ، وحدوث نزف في اللثة

العزلات البكتيرية	استخدام المسواك		التدخين		حدوث نزف في اللثة	
	يستخدم	لا يستخدم	يدخن	لا يدخن	حدوث نزف	عدم حدوث نزف
	1 (6.6 %)	14 (93.3 %)	2 (13.3 %)	13 (86.66 %)	7 (46.6 %)	8 (53.3 %)
المجموع	15 (100 %)		15 (100 %)		15 (100 %)	
P Value	0.37		0.35		0.36	

اظهر المستخلص المائي الحار لنبات المسواك وجود فروقات عالية المعنوية عند مستوى احتمالية

تأثير مستخلص نبات المسواك في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرضى التهاب اللثة تأثير مستخلص نبات

($P < 0.05$) على بكتريا *S. aureus* ، إذ كانت أقطار التثبيط عالية تراوحت بين (2.69 ± 3.53) ملم عند التركيز 20 % ، و (2.98 ± 9.86) عند التركيز 50 % أي كانت هناك فروق معنوية بين أعلى وأوطأ تركيز . ويتضح ان التركيز 50 % كان الأكثر فعالية من التراكيز (40 % ، 30 % ، 20 %) كما هو مبين في جدول (4) وهذه النتائج تتفق مع الدراسات الأخرى التي وجدت انه كلما زاد التركيز كلما كان التأثير أكثر على هذه البكتريا [16 ، 17] . في حين اختلفت النتائج مع دراسة الباحث Almas (2001) الذي لم يجد أي تأثير لهذا المستخلص على بكتريا *S. aureus* وقد عزي الباحث ذلك إلى أن المستخلص لم يكن طازجا واستخدمه بعد شهر من تحضيره .

جدول (4) تأثير مستخلص المسواك والمضادات الحيوية على العزلات البكتيرية

L.S.D	S.D	المتوسطات	التراكيز	
0.297	$2.69 \pm$	3.53	20 %	مستخلص المسواك
	$3.13 \pm$	5.6	30 %	
	$2.44 \pm$	6.66	40 %	
	$2.98 \pm$	9.86	50 %	
	$3.4 \pm$	5.26	VA	
	$5.02 \pm$	3.2	PY	المضادات الحيوية
	$5.88 \pm$	11.86	PRL	

ان استجابة *Staph aureus* (الموجبة لصبغة كرام) لتأثير المستخلص قد يعود سببه الى التركيب البنائي للجدار البكتيري اذ تفتقر هذه البكتريا الى طبقة من الأغشية الخارجية تجعل نفاذية المواد الى داخل الخلية اكبر [14] . فضلا عن ذلك فقد أكدت العديد من الدراسات ان نبات المسواك له دور فعال في تقليل نسبة البكتريا في اللعاب واللويحات البكتيرية السنية تحت اللثوية ، اذ يحتوي على مجموعات مضادة للبكتريا تشمل NO_3^- ، SCN^- ، SO_4^{2-} ، Cl_2 (تعمل على تثبيط نمو العديد من أنواع البكتريا ومنها *Staph aureus* [3 ، 18] .

كما دلت النتائج على وجود فروقات معنوية بين تأثير المسواك بتراكيز (50 % ، 40 % ، 30 %) وبين حساسية العزلات لمضادي الفانكومايسن والكاربنسلين وهذا بسبب زيادة مقاومة البكتريا للمضادات المذكورة [9 ، 14] . في حين اظهرت مقاومة اقل لمضاد البيراسلين (بنسلين من الجيل الثالث) وقد يعود السبب في ذلك الى فعالية هذا المضاد وقلة انتشار العزلات المقاومة له المعزولة من التهابات اللثة .

تأثير مستخلص نبات المسواك في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرضى التهاب اللثة تأثير مستخلص نبات

وبذلك أثبتت هذه الدراسة بان العلاقة طردية بين تراكيز مستخلص المسواك وفعاليتته ضد البكتريا المدروسة فضلا عن ذلك فقد اظهر تأثير المستخلص في العزلات البكتيرية مقارنة مع تأثير بعض المضادات فوارق معنوية .

المصادر

- 1- Nisengard J. R., and M.G.Newman .(1994) . Oral microbiology and immunology. 2th ed., W. B. Saunders, Philadelphia
- 2- اسامة ابراهيم وحامد احمد (2000) مقارنة بين فعالية تنظيف المسواك وفرشاة الاسنان. مجلة جامعة دمشق المجلد السادس عشر . العدد الثاني . 153- 177
- 3- Darout, I.A and Skaug, N. (2004) Comparative oral health status of an adult Sudanese population using miswak or tooth brush regularly Saudi.Den. J. 16 (1) : 29-38 .
- 4- Almas, K. (2001) The antimicrobial effects of seven different types of Asian chewing sticks (2001) . Odonto-Stomatologie Tropicale 96: 17-20 .
- 5- Al-sadhan, R .and Almas, K .(1999).Miswak (chewing stick) and scientific heritage . Saudi. Den. J. 11 (2) : 80-87 .
- 6- يامين احمد كامل (2009) النباتات والأعشاب التي عالج بها الرسول (صلى الله عليه وسلم) . الطبعة الأولى . دار حمورابي والإسراء للنشر والتوزيع . عمان . الاردن .
- 7- Poureslami, H.R ; Makarem, A and Mojab, F (2007) . Paraclinical effects of miswak extract on dental plaque . Den .Res . J ., 4 (2) : 106-110 .
- 8- Darout, I. A ; Christy, A. and Skaug, N .(2000) . Identification and quantification of some potentially antimicrobial anionic components in miswak extract. Indian . J. Pharmacol., 32: 11-14 .
- 8- الدليمي ، فاطمة إبراهيم سلطان (2006) . التأثير التثبيطي لمستخلصات بعض النباتات الطبية والتاثر بين مكوناتها الفعالة والمضادات الحيوية في جرثومتي Staphyalococcus aureus و Salmonella typhimurium المعزولتين من حالات التسمم الغذائي . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة الموصل .

تأثير مستخلص نبات المسواك في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مرضى

التهاب اللثة تأثير مستخلص نبات

10- العلي ، عمر موفق انور (2007) . تأثير المستخلصات المائية الحارة والكحولية الباردة لثمرة التين *Ficus carica domestica* وقشرة الرمان *Punica granatum* على بعض الاحياء المجهرية المعزولة من الجروح والحروق. رسالة ماجستير . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .

11- حموشي ، رواء محمود داود . (2004) . التأثير التثبيطي لعدد من النباتات الطبية على جرثومة *Staphylococcus aureus* المعزولة من اخماج جلدية مختلفة . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة الموصل .

12- Collee, J.G ; Fraser, A. G ; Marmion, B.P. and Simmions, A.(1996) .

Mackie & Mc Cartney Practical Medical Microbiology , 14th . USA .

13- Koneman, E. W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenber, P . C. and Microbiology Winn, W. C. (1997). Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed., J.B.Lippincott company, Philadelphia. New York .

14- الربيعي ، زيد شاكر ناجي (2000) تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتي الحنظل *Citrullus colocynthis* وعنب الذيب *Solanum nigrum* في نمو بعض البكتريا المعزولة من اخماج الحروق. رسالة ماجستير . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .

محمد ، بان طه (1995) . تأثير مستخلص نبات الحامول *Cuscuta spp* في انبات ونمو بعض الانواع النباتية . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بابل .

16- Al-bayati, F.A ; Sulaiman, K.D (2008) In vitro antimicrobial activity of *salvadora persica* against some isolated oral pathogens in Iraq . Turk . J . Bi 32 : 57-62 .

17- Eid,M.A ; Selim H.A ; Al-Shammery, A.R (1990) The relationship between chewing sticks (Miswak) and periodontal heath . Part.I.Rwview of the literature and profile of the subjets . Quintessence. Int 21: 913-917 .

18- Darout, I .A and Skaug, N. (2004) Comparative oral health status of an adult Sudanese population using miswak or tooth brush regularly. Saudi. Den. J. 16 (1) : 29-38 .