

НАКОПЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ ТРАВЫ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО, СОБРАННОГО В РАЗЛИЧНЫХ УРБО- И АГРОБИОЦЕНОЗАХ ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Н. А. Дьякова, С. П. Гапонов, А. И. Сливкин, Е. А. Бобина, Л. А. Шишорина

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 11.02.2020 г.

Аннотация. Важным и малоисследованным аспектом влияния хозяйственной деятельности человека на лекарственные растения является то, что в ответ на увеличение антропогенной нагрузки индуцируется дополнительный синтез вторичных метаболитов, прежде всего флавоноидов, которые играют важную роль в адаптации растений к изменяющимся условиям. Синантропным видом, сырье которого заготавливается от дикорастущих особей, является тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium*) – многолетнее, повсеместно встречающееся, травянистое растение. Целью исследования являлось изучение накопления флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного, собранного в различных с точки зрения антропогенного воздействия агро- и урбобиогеоценозах Воронежской области. В рамках проведения исследования в 51 образцах травы тысячелистника обыкновенного, собранного в различных с точки зрения антропогенного влияния районах области, определено содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин. Определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в отобранных образцах травы тысячелистника обыкновенного вели по стандартной фармакопейной методике на спектрофотометре СФ-2000. Каждое определение проводили трехкратно. Данные, полученные в ходе исследований, статистически обрабатывали в «Microsoft Excel». Все образцы удовлетворяют имеющимся требованиям нормативной документации данному показателю. Выявлено, что в траве тысячелистника обыкновенного, собранного в агробиогеоценозах, содержание флавоноидов в среднем в 1.2 раза выше, чем в образцах, собранных в естественных биоценозах заповедных зон, а в сырье, собранном в ряде урбобиогеоценозов – до 2 раза выше, чем в образцах контрольных заповедных зон. Данный факт можно объяснить биохимическим приспособлением растения к значительным окислительным стрессам, в ответ на которые происходит индукция синтеза полифенольных веществ, главными представителями которых являются флавоноиды. При этом, вдоль крупных автомобильных дорог с высокой интенсивностью движения нами было отмечено значительное относительное снижение содержания флавоноидов в пересчете на лютеолин. Это позволяет предположить, что при чрезмерном токсическом влиянии поллютантов происходит подавление антиоксидантной системы растений.

Ключевые слова: Воронежская область, тысячелистник обыкновенный, флавоноиды, лютеолин

На сегодняшний день в медицинской и фармацевтической практике нашей страны применяется более 6 тысяч лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного сырья. Значительный интерес к таким лекарственным средствам объясняется тем, что фитопрепараты обладают хорошим терапевтическим эффектом и относительной безвредностью. Большая доля заготовок фитосырья расположена в европейской части Российской Федерации, отличающейся значительной плотностью населения, высокой

активностью хозяйственной деятельности, развитием транспортных магистралей [1,2]. В связи с этим увеличивается угроза сбора растительного сырья в экологически неблагоприятных районах, и возрастает актуальность выявления влияния антропогенного загрязнения на химический состав растений [3].

Синантропным видом, сырье которого заготавливается от дикорастущих особей является тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium*) – многолетнее, повсеместно встречающееся, травянистое растение, широко используемое в медицине и фармации с выраженным кровооста-

навливающим, противовоспалительным и анти-септическим эффектом. Такое широкое применение обусловлено богатым химическим составом травы тысячелистника обыкновенного, основу которого составляют флавоноиды, алкалоиды (до 0.4%), дубильные вещества (до 2.5%), эфирное масло (до 0.8%), иридоиды, горечи, каротин, витамин С, макро- и микроэлементы [4,5,6,7].

Важным и малоисследованным аспектом влияния хозяйственной деятельности человека на лекарственные растения является то, что в ответ на увеличение антропогенной нагрузки индуцируется дополнительный синтез вторичных метаболитов, которые играют важную роль в адаптации растений к изменяющимся условиям. Известно, что лигандами для хелатирования токсичных веществ являются органические кислоты, аминокислоты, пептиды, при этом некоторые вторичные метаболиты, например, фенольные соединения, могут являться хелаторами и принимать участие в детоксикации поллютантов в растительном организме. Важнейшую роль среди низкомолекулярных фенольных соединений составляют флавоноиды, повышение их содержания является одной из неспецифических реакций на стрессовое воздействие окружающей среды [8,9,10].

Цель исследования – изучение накопления флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного, собранного в различных с точки зрения антропогенного воздействия агро- и урбобиогеоценозах Воронежской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор территорий для отбора образцов растительного сырья обусловлен особенностями антропогенного воздействия (рис. 1, табл. 1): химические промышленные предприятия (рис. 1: 23, 24, 28); теплоэлектроцентраль (ТЭЦ) (рис. 1: 27); атомная электростанция (АЭС) в г. Нововоронеж (рис. 1: 8); международный аэропорт им. Петра I (рис. 1: 30); улица г. Воронежа (ул. Димитрова) (рис. 1: 31); высоковольтные линии электропередач (ВЛЭ) (рис. 1: 9); Воронежское водохранилище (рис. 1: 29); малые города (г. Борисоглебск (рис. 1: 25), г. Калач (рис. 1: 26)); зона значительного месторождения никелевых руд (рис. 1: 4); районы, находящиеся в зоне радиоактивного загрязнения после аварии на Чернобыльской АЭС (рис. 1: 5-7); районы активного ведения сельского хозяйства (рис. 1: 10-22); фон (для сравнения) – заповедные территории (рис. 1: 1,2,3)). Также

проводили отбор проб вдоль дорог разной степени загруженности: лесная зона (рис. 1: 32) - трасса М4 «Дон», лесостепная зона (рис. 1: 33) – трасса А144 «Курск-Саратов», степная зона (рис. 1: 34) - трасса М4 «Дон», проселочная автомобильная дорога малой загруженности (рис. 1: 35) и железная дорога (рис. 1: 36).

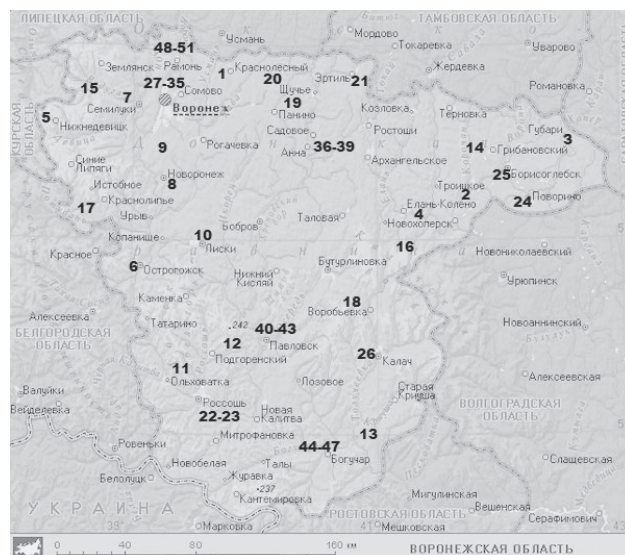


Рис. 1. Карта отбора образцов лекарственного растительного сырья (расшифровка обозначений в табл. 1)

Определение содержания суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в отобранных образцах травы тысячелистника обыкновенного вели по стандартной фармакопейной методике [11] на спектрофотометре СФ-2000. Каждое определение проводили трехкратно. Данные, полученные в ходе исследований, статистически обрабатывали в «Microsoft Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определяемые показатели содержания биологически активных веществ в траве тысячелистника обыкновенного приведены в табл. 1.

Результаты исследований показали, что все образцы травы тысячелистника обыкновенного соответствуют требованиям ФС по содержанию флавоноидов в пересчете на лютеолин. Образцы, собранные на контрольных территориях, содержат данную группу биологически активных веществ примерно в 2 раза больше нижнего допустимого числового значения [11].

В агроценозах Воронежской области содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин в траве тысячелистника обыкновенного варьирует в диапазоне от 0.59% до 1.32% (в Борисоглебском, Россошанском, Новохоперском, Панинском,

Содержание биологически активных веществ в образцах травы тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium L.*)

№ п/п	Район сбора	Содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин, %	№ п/п	Район сбора	Содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин, %
1	Воронежский природный биосферный заповедник	0.88±0.07	27	Вблизи ТЭЦ «ВОГРЭС»	1.23±0.08
2	Хоперский государственный природный заповедник	0.82±0.08	28	Вблизи ООО «Сибур»	1.32±0.08
3	с. Макашевка (Борисоглебский район)	0.86±0.09	29	Вдоль Воронежского вдхр.	1.07±0.07
4	с. Елань-Колено	0.71±0.08	30	Аэропорт им. Петра I	1.32±0.08
5	с. Нижнедевицк	0.81±0.07	31	Улица г. Воронеж (ул. Димитрова)	1.62±0.06
6	г. Острогосжск	0.97±0.09	32	Вдоль трассы М4 (Рамонский район)	0.57±0.06
7	г. Семилуки	0.59±0.08	33	100 м от трассы М4 (Рамонский район)	1.04±0.08
8	г. Нововоронеж	1.23±0.06	34	200 м от трассы М4 (Рамонский район)	1.08±0.07
9	ВЛЭ	1.26±0.09	35	300 м от трассы М4 (Рамонский район)	1.62±0.07
10	Лискинский район	0.95±0.06	36	Вдоль трассы А144	0.64±0.09
11	Ольховатский район	0.85±0.07	37	100 м от трассы А144	0.75±0.08
12	Подгоренский район	0.86±0.07	38	200 м от трассы А144	0.79±0.06
13	Петропавловский район	1.12±0.09	39	300 м от трассы А144	0.80±0.09
14	Грибановский район	1.06±0.05	40	Вдоль трассы М4 (Павловский район)	1.09±0.07
15	Хохольский район	1.04±0.06	41	100 м от трассы М4 (Павловский район)	1.04±0.08
16	Новохоперский район	1.32±0.05	42	200 м от трассы М4 (Павловский район)	1.02±0.09
17	Репьевский район	0.82±0.05	43	300 м от трассы М4 (Павловский район)	1.44±0.09
18	Воробьевский район	1.09±0.08	44	Вдоль нескоростной дороги	1.20±0.08
19	Панинский район	0.87±0.09	45	100 м от нескоростной дороги	1.05±0.08
20	Верхнехавский район	0.88±0.10	46	200 м от нескоростной дороги	1.17±0.06
21	г. Эртиль	1.10±0.07	47	300 м нескоростной дороги	1.07±0.06
22	Росошанский район	0.95±0.08	48	Вдоль железной дороги	0.99±0.08
23	Вблизи ОАО «Минудобрения»	1.33±0.06	49	100 м от железной дороги	0.80±0.09
24	Вблизи ООО «Бормаш»	1.23±0.06	50	200 м от железной дороги	0.75±0.07
25	г. Борисоглебск	1.13±0.06	51	300 м от железной дороги	1.16±0.09
26	г. Калач	1.02±0.07	Числовой показатель по ФС [11]		Не менее 0.4

Ольховатском, Воробьевском, Подгоренском, Петропавловском, Грибановском, Лискинском, Хохольском, Репьевском, Верхнехавском районах, г. Семилуки, с. Елань-Колено, с. Нижнедевицк.). Среднее содержание флавоноидов в образцах, собранных вблизи сельскохозяйственных угодий, составляет 0,94%, что примерно в 2.5 раза превышает установленный нормативной документацией числовой показатель и в 1.2 раза превышает содержание флавоноидов в образцах контрольных заповедных зон. В этих местах осуществляется активное растениеводство, для которого характерно внесение большого количества удобрения

в почву, что является активирующим фактором для фермента фенилаланинаммиаклиаза который является ключевым ферментом в фенилпропаноидном пути биосинтеза флавоноидов [8,12,13].

В урбобиоценозах Воронежской области содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин в образцах травы тысячелистника обыкновенного варьирует в диапазоне от 0.97% до 1.62%, что до 2 раз превышает содержание флавоноидов в образцах контрольных заповедных зон. Особенно высокий уровень накопления данной группы биологически активных веществ отмечен для образцов, собранных вблизи следующих объектов:

ОАО «Минудобрения» в Россошанском районе, химическое предприятие ООО «Воронежский Гипрокаучук», на улицах городов Борисоглебск, Калач, Воронеж, Поворино, Острогожск, Нововоронеж, Эртиль, а также под воздушной линией электропередач, вдоль нескоростной автомобильной дороги и вдоль железнодорожного полотна. Выявленная индукция синтеза полифенолов, вероятно, связана с их мембраностабилизирующим действием в условиях окислительного стресса. Таким образом, данный факт можно считать механизмом естественной защиты от загрязнения окружающей среды, направленным на сохранение растительным организмом внутриклеточных компонентов, восприимчивых к окислительно-восстановительным воздействиям [14,15,16].

Для крупных трасс (М4, А144) была замечена следующая особенность: содержание флавоноидов в образцах, собранных на расстоянии 300 м от дороги, значительно превышает содержание в образцах, собранных непосредственно вдоль трасс. Следовательно, при удалении от автомобильной трассы происходит резкое увеличение содержания флавоноидов. Объяснить это можно тем, что синтез вторичных метаболитов активизируется в ответ на стимулирующие факторы, в частности, на высокие концентрации токсичных химических элементов, при этом каждый фактор имеет определенные пределы положительного влияния на организмы, как недостаточное, так и избыточное действие фактора может отрицательно сказаться на жизнедеятельности особи. Действие суммы факторов, таких как повышенная запыленность, наличие в воздухе большого количества выхлопных газов, а также высокая концентрация токсических веществ в почве, отражается на физиологических особенностях растений и влияет на силу токсического действия поллютантов. В данном случае избыточное влияние выбросов автомобильного транспорта, вероятно, подавляет антиоксидантную систему растения и тормозит выработку флавоноловых полифенолов [17,18]. Также возможным объяснением снижения содержания флавоноидов в образцах, собранных вблизи автострад является также тот факт, что флавоноиды благодаря наличию большого количества ОН-заместителей в химической структуре, являются хелаторами ионов металлов, что и определяет их антиоксидантные свойства. При этом, будучи в связанном виде, они не дают реакции комплексообразования с алюминия хлоридом, лежащей в основе спектрофотометрического определения

этой группы соединений, а потому мы получаем сниженный показатель поглощения анализируемого извлечения из данного сырья [19,20].

ВЫВОДЫ

Проанализировано свыше 50 образцов травы тысячелистника обыкновенного, собранных в различных агро- и урбобиогеоценозах Воронежской области, в которых определено содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин. Все отобранное лекарственное растительное сырье по результатам проведенных нами исследований признано доброкачественным по данному показателю. Содержание флавоноидов в образцах, собранных в агробиогеоценозах в среднем в 1.2 раза превышает количество флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного, собранного в биоценозах заповедных зон. Содержание исследуемой группы биологически активных веществ урбобиогеоценозов Воронежской области, в среднем выше в 1.3 - 2 раза, чем в образцах естественных биоценозов заповедных зон. Это объясняется тем, что фермент фенилаланинаммиаклиаза имеет ярко выраженную стресс-индуцибельность. Что усиливает синтез флавоноидов, играющих роль антиоксидантных веществ, в ответ на окислительный стресс. Также было отмечено, в результате комплексного токсического воздействия на растительный организм, что наблюдается, к примеру, вблизи крупных автострад, возможно подавление антиоксидантной системы растения и снижение биосинтеза флавоноловых полифенолов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dyakova N.A., Slivkin A.I., Gaponov S.P., Myndra A.A., Samylina I.A. // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015. Т. 49. № 6. pp. 384-387.
2. Dyakova N.A., Slivkin A.I., Gaponov S.P., Myndra A.A., Samylina I.A. // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018. Т. 52. № 3. pp. 220-223. DOI: 10.1007/s11094-018-1797-2
3. Великанова Н.А., Гапонов С.П., Сливкин А.И. Экооценка лекарственного растительного сырья в урбоусловиях г. Воронежа. LAMBERT Academic Publishing, 2013, 211 с.
4. Куркин, В.А. Фармакогнозия. Самара, Офорт, 2004, 176 с.
5. Aljancic I, Vajs V, Menkovic N, Karadzic I, Juranic N, Milosavljevic S, Macura S. // *J. Nat. Prod.* 1999. Vol. 62(6), pp. 909—911.
6. Chandler R.F., Hooper S.N., Harvey M.J. // *Econ. Bot.* 1982. Vol. 36, №2, pp. 203—223.

7. Falk A.J. et al. // J. Pham. Sci. 1975. Vol. 64, № 11, pp. 1838—1842.
8. Баяндина И.И., Загурская Ю.В. // Сибирский медицинский журнал. – 2014. - № 8. – с. 107-111.
9. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино, Synchronobook, 2013, 310 с.
10. Kováčik J., Klejdus B., Hedbavny J., Zoň J. // Journal of Plant Physiology. 2011. Vol. 168. №6, pp. 576-584.
11. Государственная фармакопея Российской Федерации. Изд. XIV. Т. 4. Москва, ФЭМБ, 2018. с. 6508-6514.
12. Loreto F., Schnitzler J.-P. // Trends in Plant Science. 2010. Vol. 15, pp.154-166.
13. Ferdinando M.D., Brunetti C., Fini A., Tattini M. // Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. New York, 2012, pp.159-179.
14. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Papanga G. // Free Radical Biology and Medicine. 1996. Vol. 20, pp.933-956.
15. Winkel-Shirley B. // Current Opinion in Plant Biology. 2002. Vol. 5, pp. 218-223.
16. Agati G., Tattini M. // New Phytol. 2010. Vol. 186, pp. 786-793.
17. Peer W.A., Murphy A.S. // Trends Plant Science. 2007. Vol. 12, pp.556-563.
18. Holopainen J.K., Gershenzon J. // Trends in Plant Science. 2010. Vol. 15, pp.176-184.
19. Wang H., Cao J., Xu Sh. // Journal of Chromatography A. 2013. Vol. 1315, pp.107-117.
20. Wink M. // Phytochemistry. 2003. Vol. 64, pp.3-19.

*Воронежский государственный университет
Дьякова Н. А., к.б.н., доц. каф. фармацевтической химии и фармацевтической технологии
E-mail: ninochka_v89@mail.ru*

*Voronezh State University
Dyakova N. A., PhD., Assistant Professor,
pharmaceutical chemistry and pharmaceutical
technology dept.
E-mail: ninochka_v89@mail.ru*

*Сливкин А. И., д.фарм.н., проф., зав. каф. фармацевтической химии и фармацевтической технологии
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru*

*Slivkin A. Y., PhD, DSci, Full Professor, Head of
the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical
technology department
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru*

*Гапонов С. П., д.б.н., проф., зав. каф. зоологии и паразитологии
E-mail: gaponov2003@mail.ru*

*Gaponov S. P., PhD, DSci, Full Professor, Head
of the Department of Zoology and Parasitology
E-mail: gaponov2003@mail.ru*

*Бобина Е. А., студентка 3 курса
E-mail: elisbobina@mail.ru*

*Bobina E. A. 3 course student
E-mail: elisbobina@mail.ru*

*Шшиорина Л. А., студентка 3 курса
E-mail: lilishisorina@mail.ru*

*Shishorina L. A., 3 course student
E-mail: lilishisorina@mail.ru*

ACCUMULATION OF FLAVONOIDS WITH GRASS OF THOUSAND CHILLI COLLECTED IN VARIOUS URBAN AND AGROBIOCENOSSES OF THE VORONEZH REGION

N.A. Dyakova, S.P. Gaponov, A.I. Slivkin, E.A. Bobina, L.A. Shishorina

Voronezh State University

Abstract. An important and little-researched aspect of the effect of human economic activity on medicinal plants is that in response to an increase in anthropogenic load, additional synthesis of secondary metabolites, especially flavonoids, is induced, which play an important role in adapting plants to changing

conditions. The synanthropic species, the raw material of which is harvested from wild individuals, is the common thousand-leaf (*Achillea millefolium*) - a perennial, ubiquitous, herbaceous plant. The purpose of the study was to study the accumulation of flavonoids in the grass of a thousand-leaf common, collected in various agricultural and urbobiogeocenoses of the Voronezh region from the point of view of anthropogenic impact. In the framework of the study, 51 samples of the grass of a thousand-leaf common, collected in areas different from the point of view of anthropogenic influence, determined the content of flavonoids in terms of luteolin. Determination of the content of the sum of flavonoids in terms of luteolin in the selected samples of herb of the common thyroid was carried out according to the standard pharmacopoeia technique on a spectrophotometer СФ-2000. Each determination was carried out three times. The data obtained during the studies were statistically processed in Microsoft Excel. All samples meet the requirements of the regulatory documentation for this indicator. It was revealed that in the grass of a thousand-leaf common, collected in agrobiogeocenoses, the content of flavonoids is on average 1.2 times higher than in samples collected in natural biocenoses of protected areas, and in raw materials collected in a number of urbobiogeocenoses - up to 2 times higher than in samples of control protected areas. This fact can be explained by the biochemical adaptation of the plant to significant oxidative stresses, in response to which the synthesis of polyphenol substances, the main representatives of which are flavonoids, is induced. At the same time, along major highways with high traffic intensity, we noted a significant relative decrease in the content of flavonoids in terms of luteolin. This suggests that with the excessive toxic influence of pollutants, the antioxidant system of plants is suppressed.

Keywords: Voronezh region, thousand common, flavonoids, luteolin

REFERENCES

1. Dyakova N.A., Slivkin A.I., Gaponov S.P., Myndra A.A., Samylina I.A. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2015, Vol. 49, No 6, pp. 384-387. DOI: 10.1007/s11094-015-1289-6
2. Dyakova N.A., Slivkin A.I., Gaponov S.P., Myndra A.A., Samylina I.A. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2018, Vol. 52, No 3, pp. 220-223. DOI: 10.1007/s11094-018-1797-2
3. Velikanova, N.A., Gaponov S.P., Slivkin A.I. EHkoocenka lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya v urbousloviyah g. Voronezha. LAMBERT Academic Publishing, 2013, 211 p.
4. Kurkin V.A. Farmakognoziya. Samara, Ofort, 2004, pp. 388-393.
5. Aljancic I, Vajs V, Menkovic N, Karadzic I, Juranic N, Milosavljevic S, Macura S. J. Nat. Prod., 1999, Vol. 62(6), pp. 909—911.
6. Chandler R.F., Hooper S.N., Harvey M.J. Econ. Bot., 1982, Vol. 36, No. 2, pp. 203—223.
7. Falk A.J. et al. J. Pham. Sci, 1975, Vol. 64, No. 11, pp. 1838—1842.
8. Bayandina I.I., Zagurskaya Yu.V. Sibirskij medicinskij zhurnal, 2014, No. 8, pp. 107-111.
9. Tarahovskij Ju.S., Kim Ju.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov E.N. The Flavonoids: Biochemistry, Biophysics, Medicine – Pushhino: Sunchrobook, 2013, 310 p.
10. Kovacik J., Klejdus B., Hedbavny J., Zon J. Journal of Plant Physiology, 2011, Vol. 168, No. 6, pp.576-584.
11. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. Izdanie XIV, 2018, Vol. 2, Moscow, FEMB, pp. 6508-6514.
12. Loreto F., Schnitzler J.-P. Trends in Plant Science, 2010, Vol. 15, pp. 154-166.
13. Ferdinando M.D., Brunetti C., Fini A., Tattini M. Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability, New York, 2012, pp.159-179.
14. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Papanga G. Free Radical Biology and Medicine, 1996, Vol. 20, pp. 933-956.
15. Winkel-Shirley B. Current Opinion in Plant Biology, 2002, Vol. 5, pp. 218-223.
16. Agati G., Tattini M. New Phytol, 2010, Vol. 186, pp.786-793.
17. Peer W.A., Trends Plant Science, 2007, Vol. 12, pp.556-563.
18. Holopainen J.K., Gershenzon J. Trends in Plant Science, 2010, Vol. 15, pp.176-184.
19. Wang H., Cao J., Xu Sh. Journal of Chromatography A, 2013, Vol. 1315, pp.107-117.
20. Wink M. Phytochemistry, 2003, Vol. 64, pp. 3-19.