

Pembuatan Protokol Penapisan Virtual Berbasis Struktur (pvbs) untuk Identifikasi Ligan Inhibitor Reseptor Platelet-Activating Factor (PAF-r) sebagai Target Terapeutik Asma menggunakan YASARA

Gerry Nugraha^{1*} Enade Perdana Istyastono²

¹Farmasi, STIKES 'Aisyiyah Palembang

²Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

Corresponding Author:
Gerry Nugraha
ge6nugraha@gmail.com

Received: February 2020
Accepted: March 2020
Published: March 2020

©Gerry Nugraha. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Platelet-activating factor receptors (PAF-r) is known as one of the receptors that affect asthma, while the Y-21480 ligand is reported as an effective, specific, and active PAF-r antagonist for asthma patients. Research in building structure-based virtual screening protocol (SBVS) for identification of PAF-r ligand inhibitors has been performed, the receptor crystal structure was obtained from the Protein Data Bank (PDB ID: 5zkp), while the ligand used as a leading compound is Y-24180, obtained from U.S. National Library of Medicine. Interactions between ligands and receptors are observed through molecular dynamics simulations using the YASARA program at intervals up to 20 nanoseconds, ligand-receptor binding stability occurs after a time interval of 2 nanoseconds, the lowest ligand-receptor binding energy occurs at a time interval of 1,401 picoseconds. Internal validation by re-docking 1,000 times the ligand to receptor resulted in a value of Root Mean Square Deviation (RMSD) of 0.6037 Å, confirmed that SBVS protocol was accurately able to reproduce the Y-24180 ligand pose on the 5zkp crystal structure, the protocol can be used as a new approach for investigation or design of compounds that have therapeutic potential as anti-asthma.

Keywords: *Asthma, PAF-r, SBVS, in silico, molecular dynamics*

Pendahuluan

Penyebab utama kematian tahun 2008 pada saluran pernapasan, termasuk asma di dalamnya, di dunia sebanyak 4.2 juta jiwa, menurut perkiraan WHO yang dirilis Desember 2016, terdapat 383,000 kematian akibat asma selama tahun 2015^[1]. Asma adalah penyakit inflamasi kronik, disebabkan faktor genetik dan lingkungan, menyerang sekitar 300

juta orang secara global, sementara itu satu dari setiap 250 kematian disebabkan karena asma^[2].

Di Indonesia sendiri, data terbaru jumlah penderita asma meningkat setiap tahun, total pasien asma rawat inap terbanyak terjadi pada tahun 2016, begitu juga pasien yang keluar rawat inap dalam keadaan meninggal karena asma paling tinggi pada tahun 2016 (Tabel 1)^[3].

Respon imun dan inflamasi pada asma dipengaruhi oleh *platelet-activating factor* (PAF), terlibat dalam patogenesis asma dengan menginduksi bronkokonstriksi, meningkatkan permeabilitas pembuluh darah paru-paru, mengaktifkan sel-sel inflamasi di saluran udara bagian bawah^[4], mendukung produksi lendir^[5], dan meningkatkan hiperreaktivitas jalan nafas^[6]. PAF diproduksi sebagai respons terhadap beberapa stimulus pro-inflamasi seperti alergen^[7], peningkatan kadarnya dalam sampel dahak dan *bronchoalveolar* pasien asma telah ditemukan selama serangan asma^[8]. PAF adalah mediator penting yang terlibat dalam respons bronkus hiperaktif pada manusia^[9], strukturnya dikenal sebagai AGEPC (*acetyl-glycerol-ether-phosphorylcholine*) seperti yang terlihat pada Gambar 1^[10].

Selain pada asma^[11], PAF berperan besar sebagai mediator pada beberapa penyakit kronis, termasuk kardiovaskular^[12], kanker^[13], penyakit ginjal^[14], serebrovaskular dan gangguan sistem saraf pusat^[15], infeksi^[16], dan alergi^[17]. PAF juga berperan dalam penyembuhan luka^[18], reproduksi, angiogenesis, *long-term potentiation* (LTP), dan pensinyalan retrograde^[19], jalur renovasi

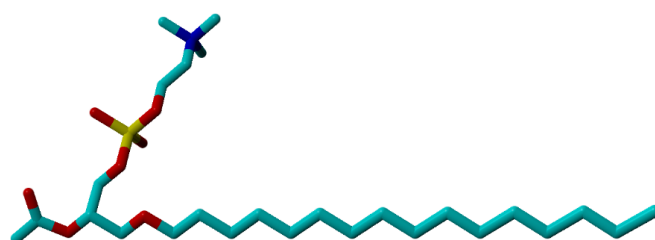
enzimatik dari biosintesis PAF bertanggung jawab pada peradangan akut dan kronis^[20].

Cao *et al.*^[21] baru-baru ini memperkenalkan struktur kristal reseptor PAF manusia (PAF-r), penemuan struktur ini membuka jalan untuk menjelaskan kapasitas PAF-r dalam mengikat berbagai ligan, memungkinkan untuk pengembangan strategi terapi yang efektif terhadap jalur reseptor PAF^[22], ketika perannya dalam berbagai penyakit menjadi jelas, penemuan dan perancangan molekul penghambat reseptor PAF dapat ditingkatkan^[20].

Penemuan obat baru yang dimulai dengan proses pencarian aktivitas senyawa terhadap efek farmakokinetiknya, hingga pemanfaatan fungsi spesifik suatu obat, memerlukan biaya rata-rata 802 juta US dolar^[23]. Pendekatan teoritis berbasis komputer atau uji *in silico* sangat penting untuk merancang, menemukan, dan optimisasi senyawa bioaktif dalam proses pengembangan obat^[24], pendekatan ini membutuhkan waktu penelitian yang lebih sedikit dan biaya yang jauh lebih murah, penapisan data set molekul dari senyawa model dapat dijadikan proses yang efektif dalam mendesain obat^[25].

Tabel 1. Nilai RSD sampel herbal

Tahun	Pasien rawat inap	Pasien keluar meninggal	Pasien rawat jalan
2015	28,050	679	195,319
2016	56,405	2,805	471,350
2017	53,949	1,182	937,367



Gambar 1. Struktur 3D PAF.

Peran reseptor PAF yang besar pada banyak penyakit, termasuk asma, menjadi latar belakang perlunya mengembangkan penelitian terkait aspek-aspek utama mengenai PAF-r sebagai target pengobatan asma masa depan, juga terkait pembaruan terkini meliputi ligan, dan pemodelan molekul. Tujuan penelitian ini fokus pada simulasi *in silico* reseptor PAF dengan senyawa penuntun Y-24180 yang diketahui sebagai antagonis reseptor PAF^[9], senyawa ini juga diketahui efektif menekan respons hiper-antigen yang diinduksi antigen pada hewan^[26].

Hipotesis yang dibangun bahwa senyawa Y-24180 dapat digunakan sebagai senyawa penuntun dalam pengembangan protokol penapisan virtual berbasis struktur (PVBS), dengan harapan protokol yang dihasilkan dari simulasi virtual ini dapat dipakai untuk melakukan pencarian senyawa obat baru untuk terapi asma, baik pada senyawa-senyawa sintesis, semi sintesis, ataupun pada senyawa bahan alam

Metode Penelitian

Bahan kimia

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah struktur kristal reseptor PAF manusia (PAF-r)^[21] yang didapatkan dari Protein Data Bank dengan kode struktur 5zkp, bisa diunduh pada laman <https://www.rcsb.org/structure/5zkp>, struktur ini nantinya dijadikan sebagai target virtual. Ligan yang digunakan sebagai senyawa penuntun adalah senyawa Y-24180 (Gambar

2)^[9], strukturnya didapatkan dari laman https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/I_srapafant.

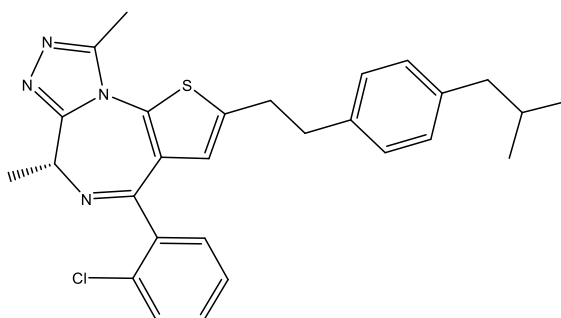
Peralatan

Alat-alat yang digunakan terdiri dari perangkat lunak dan perangkat keras, perangkat lunak yang digunakan adalah *Yet Another Scientific Artificial Reality Application* (YASARA) *structure* versi 19.12.14^[27] dan OS Ubuntu 18.04.4 LTS. Perangkat keras yang digunakan adalah server dengan spesifikasi; Dual Prosesor Intel® Xeon 2680 V3 (24 Core, 48 Thread), SSD Intel 500Gb, VGA Quadro M4000 8Gb, dan RAM 64Gb ECC Registered.

Prosedur penelitian

Penambatan ligan Y-24180 pada reseptor 5zkp

File pdb (kode: 5zkp)^[21] yang diunduh dari <https://www.rcsb.org/structure/5zkp> diolah dengan YASARA untuk memisahkan struktur reseptor dari ligan menggunakan perintah *target_prep.mcr*, reseptor disimpan sebagai 5zkp_receptor.sce. Sementara itu, ligan Y-24180 dalam bentuk 3D dibuat dengan mengunduh terlebih dahulu SMILES-nya dari laman https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/I_srapafant, disimpan dalam format *ligand.smi*, kemudian diubah menjadi struktur 3D dengan YASARA dan disimpan sebagai 5zkp_ligand.yob. Selanjutnya dilakukan penambatan 5zkp_ligand.yob pada 5zkp_receptor.sce dengan perintah *dock_run.mcr*, penambatan dilakukan 1,000 kali dengan iterasi 25 kali untuk pencarian konformasi paling stabil.



Gambar 2. Struktur 3D PAF.

Optimasi dinamika molekul

Hasil penambatan ligan Y-24180 pada reseptor 5zpk dioptimasi secara dinamika molekul untuk mendapatkan pose ikatan ligan-reseptor dengan energi terendah, optimasi dengan YASARA melalui perintah *md_runmembrane.mcr*. Optimasi dilakukan menggunakan medan gaya AMBER, pada parameter pH fisiologis 7.4, konsentrasi ion sebagai fraksi massa 0.9% NaCl (larutan fisiologis), suhu 298 K, termostat Lowe-Andersen, dan barostat 1 Bar. Durasi optimasi dikerjakan hingga 20,000 ps (*picoseconds*) atau 20 ns (*nanoseconds*), interval *snapshot* simulasi disimpan setiap 100 ps, hasil simulasi dinamika molekul selanjutnya dianalisis dengan perintah *md_analyze.mcr*.

Menghitung energi ikatan

Energi ikatan dari 2,000 *snapshot* yang dihasilkan pada simulasi dinamika molekul dihitung menggunakan YASARA dengan perintah *be_calculation.mcr*, selanjutnya dipilih energi ikatan paling rendah yang menunjukkan bahwa konformasi molekul berada pada kondisi paling stabil.

Validasi internal protokol

Senyawa terpilih dengan energi ikatan paling rendah, divalidasi dengan memisahkan struktur reseptor dengan ligan yang ada di dalamnya. Pemisahan dilakukan dengan perintah *target_prep.mcr*, struktur reseptor disimpan sebagai 5zkp_receptor.sce, sementara ligan disimpan sebagai 5zkp_ligandref.yob. Selanjutnya dilakukan penambatan ulang ligan 5zkp_ligandref.yob pada reseptor 5zkp_receptor.sce sebanyak 1,000 kali dengan iterasi 25 kali menggunakan perintah *re-dock_1000.mcr*, pose ligan hasil penambatan ulang kemudian dibandingkan nilai RMSD-nya dengan pose ligan 5zkp_ligandref.yob hasil optimasi dinamika molekul.

Hasil dan Diskusi

Simulasi dinamika molekul dapat mengamati interaksi antara ligan dengan reseptor, sekaligus melihat kestabilan ikatan yang terjadi, pengamatan mekanisme inhibisi PAF-r dengan dinamika molekul diharapkan menjadi pendekatan terapeutik baru dalam pencarian atau perancangan obat anti asma. Gambar 3 merupakan optimasi dinamika molekul pada senyawa hasil penambatan ligan Y-24180 dengan reseptor 5zpk dilakukan pada interval waktu hingga 20 ns, sistem terlihat mengalami kesetimbangan mulai interval 2 ns, setelah interval itu total energi sistem sudah stabil. Secara termodinamika, interaksi ligan dengan reseptor dapat terjadi apabila kompleks ligan-reseptor yang dihasilkan memiliki energi yang lebih rendah^[28].

Energi ikatan ligan-reseptor dihitung berdasarkan sistem hasil dinamika molekul, diketahui bahwa simulasi pada interval waktu ke 1,401 ps memiliki energi ikatan paling rendah yaitu sebesar -18,2260 kkal/mol, data didapatkan dari luaran 5zkp01401_result.log. Residu asam amino yang terlibat dalam ikatan ligan-reseptor adalah GLY 94A, PHE 97A, PHE 98A, ALA 148A, TYR 151A, PHE 152A, LEU 155A, ASP 156A, SER 157A, PHE 174A, HIS 176A, TYR 177A, GLU 178A, VAL 184A, ILE 187A, HIS 188A, ILE 191A, VAL 192A, HIS 248A, HIS 249A, GLN 252A, dan LEU 282A.

Sistem dengan energi ikatan paling rendah dipilih untuk selanjutnya dilakukan uji validasi internal, tujuannya untuk melihat kualitas dari protokol yang dihasilkan. Validasi dilakukan dengan memisahkan struktur reseptor terpilih (interval simulasi 1,401 ps) dengan ligan yang ada di dalamnya, struktur reseptor disimpan sebagai 5zkp_receptor.sce dan ligan disimpan sebagai 5zkp_ligandref.yob.

Selanjutnya dilakukan penambatan ulang ligan 5zkp_ligandref.yob sebanyak 1,000 kali dengan iterasi 25 kali pada reseptor 5zkp_receptor.sce, prosedur penambatan berulang digunakan untuk mengoptimalkan protokol, tujuannya untuk mendapatkan protokol yang dapat mengurangi ligan referensi secara akurat,

dibandingkan dengan pose struktur kristal referensi^[29].

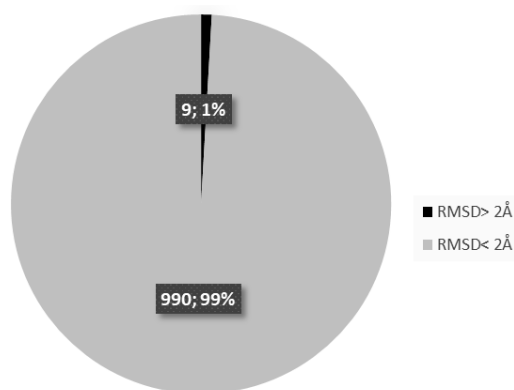
Kemudian pose ligan hasil penambatan ulang 1,000 kali dibandingkan nilai RMSDnya dengan pose ligan 5zcp_ligandref.yob hasil optimasi dinamika molekul, didapatkan nilai RMSD dibawah 2 Å ada 990 data, sementara sisanya sebanyak 10 data berada di atas 2 Å (Gambar 4). Protokol penambatan molekul dianggap dapat diterima untuk digunakan sebagai protokol penapisan virtual berbasis struktur, jika nilai RMSD dari pose struktur kristal dari ligan referensi lebih rendah dari 2 Å^[30].

Dari data percobaan penambatan ulang, nilai RMSD kemudian diolah secara statistik untuk tingkat kepercayaan 95% dengan uji *one sample t-test*, dilakukan pada seribu data RMSD dari hasil penambatan untuk mengetahui nilai RMSD yang dihasilkan seharusnya tidak lebih besar dari 2.0 Å. Nilai t-hitung yang dihasilkan sebesar 0.6037 Å, lebih kecil dari nilai t-tabel yaitu sebesar 1.9623, sehingga dapat disimpulkan bahwa RMSD dari 1,000 pose hasil penambatan ulang kurang dari atau sama dengan dari 2.0 Å secara statistik masuk dalam taraf kepercayaan 95%. Prosedur optimasi berulang menghasilkan protokol dengan nilai RMSD sebesar 0.6037 Å, nilai RMSD dibawah 1 Å adalah langkah pertama dalam pengembangan protokol PVBS yang berkualitas^[29], untuk mengidentifikasi inhibitor PAF-r.

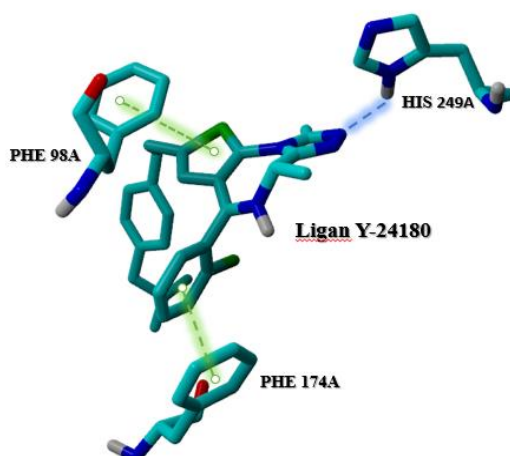
Selanjutnya dilakukan analisis pada protokol terpilih untuk melihat mode ikatan yang terjadi antara ligan dengan reseptor (Gambar 5), dari hasil pengamatan diketahui terdapat ikatan hidrogen antara atom N nomor 574 pada ligan dengan residu *histidine* (HIS) nomor *sequence* 249A, jarak ikatan H-A 2.43 Å dan jarak ikatan D-A 3.28 Å dengan sudut donor sebesar 140.44°. Ikatan hidrogen dapat terbentuk jika jarak antara donor dan akseptor ≤ 3.5 Å, sudut yang dibentuk antara atom donor hidrogen dan akseptor adalah 180° dengan simpangan yang diizinkan sebesar 45°^[30].

Selain ikatan hidrogen, juga terbentuk ikatan aromatis antara ligand dengan residu *phenylalanine* (PHE), nomor *sequence* 98A dengan jarak ikatan sebesar 3.92 Å dan sudut 8.75°. Ikatan aromatis juga terjadi dengan residu PHE 174A, dengan jarak ikatan sebesar 3.76 Å dan sudut yang terbentuk 21.40°. Ikatan aromatis bisa terbentuk jika jarak antar 2 pusat aromatis ≤ 4.0 Å, sudut yang dibentuk oleh garis tegak lurus masing-masing bidang aromatis adalah 180° dengan simpangan yang diizinkan adalah 30° (*face-to-face*), dan 90° dengan simpangan yang diizinkan adalah 60° (*edge-to-face*)^[30].

Hasil penelitian berupa berkas protokol penapisan virtual berbasis struktur, untuk identifikasi ligan inhibitor reseptor *platelet-activating factor* (PAF-r) sebagai target terapeutik asma, dapat diunduh pada laman <http://ugm.id/SBVSPAfrProtocol>.



Gambar 4. Pie Chart nilai RMSD pada pose penambatan ulang 1,000 kali.



Gambar 5. Pose ikatan ligan-reseptor.

Kesimpulan

Interaksi antara ligan Y-24180 dengan reseptor 5zqp diamati melalui simulasi dinamika molekul menunjukkan stabilitas ikatan setelah interval waktu 2 *nanoseconds*, energi ikatan ligan-reseptor paling rendah ditunjukkan pada interval waktu 1,401 *picoseconds*. Validasi internal dengan penambatan ulang ligan sebanyak 1,000 kali menghasilkan nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) sebesar 0.6037 Å, mengkonfirmasi bahwa protokol penapisan virtual berbasis struktur yang dihasilkan secara akurat mampu mereproduksi pose ligan Y-24180 dari struktur kristal 5zqp. Protokol yang dihasilkan dari penelitian ini, dapat digunakan sebagai pendekatan terapeutik baru dalam pencarian atau perancangan obat anti asma.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih saya ucapkan kepada Bapak Khoirin, SKM., M. Kes selaku Ketua Stikes 'Aisyiyah Palembang, dan Ibu Onny Indriani, M. Farm., Apt selaku Kaprodi S1 Farmasi Stikes 'Aisyiyah Palembang.

Daftar Pustaka

1. Network, G. A., The global asthma report 2018. *Auckland, New Zealand*, (2018).
2. Fergeson, J. E., Patel, S. S. & Lockey, R. F., Acute asthma, prognosis, and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **139(2)**: 438–447 (2017).
3. Kemenkes, R. I., Penderita Asma Indonesia. *Pus. data dan Inf. kemenkes RI*, 1–16 (2019).
4. Kasperska-Zajac, A., Brzoza, Z. & Rogala, B., Platelet-activating factor (PAF): A review of its role in asthma and clinical efficacy of PAF antagonists in the disease therapy. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, **2(1)**: 72–76 (2008).
5. Cuss, F., Dixon, C. . & Barnes, P., Effects of inhaled platelet activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. *Lancet*, **328(8500)**: 189–192 (1986).
6. Kuitert, L. & Barnes, N. C., PAF and asthma—time for an appraisal? *Clin. Exp. Allergy*, **25(12)**: 1159–1162 (1995).
7. Pałgan, K. & Bartuzi, Z., Platelet activating factor in allergies. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **28(4)**: 584–589 (2015).
8. Chan-Yeung, M., Lam, S., Chan, H., Tse, K. S. & Salari, H., The release of platelet-activating factor into plasma during allergen-induced bronchoconstriction. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **87(3)**: 667–673 (1991).
9. Hozawa, S., Haruta, Y., Ishioka, S. & Yamakido, M., Effects of a PAF antagonist, Y-24180, on bronchial hyperresponsiveness in patients with

- asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **152**(4): 1198–1202 (1995).
10. Demopoulos, C. A., Pinckard, R. N. & Hanahan, D. J., Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J. Biol. Chem.*, **254**(19): 9355–9358 (1979).
 11. Demopoulos, C. A., Karantonis, H. C. & Antonopoulou, S., Platelet activating factor—a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **105**(11): 705–716 (2003).
 12. Tsoupras, A., Lordan, R. & Zabetakis, I., Inflammation, not cholesterol, is a cause of chronic disease. *Nutrients*, **10**(5): 604 (2018).
 13. da Silva-Jr, I. A., Chammas, R., Lepique, A. P. & Jancar, S., Platelet-activating factor (PAF) receptor as a promising target for cancer cell repopulation after radiotherapy. *Oncogenesis*, **6**(1): e296–e296 (2017).
 14. Lordan, R., Tsoupras, A. & Zabetakis, I., The potential role of dietary platelet-activating factor inhibitors in cancer prevention and treatment. *Adv. Nutr.*, **10**(1): 148–164 (2019).
 15. Palur Ramakrishnan, A. V. K., Varghese, T. P., Vanapalli, S., Nair, N. K. & Mingate, M. D., Platelet activating factor: A potential biomarker in acute coronary syndrome? *Cardiovasc. Ther.*, **35**(1): 64–70 (2017).
 16. Tsoupras, A. B., Chini, M., Tsogas, N., Fragopoulou, E., Nomikos, T., Lioni, A., Mangafas, N., *et al.*, Anti-platelet-activating factor effects of highly active antiretroviral therapy (HAART): A new insight in the drug therapy of HIV infection? *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **24**(8): 1079–1086 (2008).
 17. Yost, C. C., Weyrich, A. S. & Zimmerman, G. A., The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. *Biochimie*, **92**(6): 692–697 (2010).
 18. Birkl, D., Quiros, M., García-Hernández, V., Zhou, D. W., Brazil, J. C., Hilgarth, R., Keeney, J., *et al.*, TNF α promotes mucosal wound repair through enhanced platelet activating factor receptor signaling in the epithelium. *Mucosal Immunol.*, **12**(4): 909–918 (2019).
 19. Suvarna, Y., Maity, N. & Shivamurthy, M. C., Emerging trends in retrograde signaling. *Mol. Neurobiol.*, **53**(4): 2572–2578 (2016).
 20. Lordan, R., Tsoupras, A., Zabetakis, I. & Demopoulos, A. C., Forty years since the structural elucidation of platelet-activating factor (PAF): Historical, current, and future research perspectives. *Molecules*, **24**(23): (2019).
 21. Cao, C., Tan, Q., Xu, C., He, L., Yang, L., Zhou, Y., Zhou, Y., *et al.*, Structural basis for signal recognition and transduction by platelet-activating-factor receptor. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**(6): 488–495 (2018).
 22. Audet, M. & Stevens, R. C., Emerging structural biology of lipid G protein-coupled receptors. *Protein Sci.*, **28**(2): 292–304 (2019).
 23. DiMasi, J. A., Hansen, R. W. & Grabowski, H. G., The price of innovation: New estimates of drug development costs. *J. Health Econ.*, **22**(2): 151–185 (2003).
 24. Hinchliffe, A., *Molecular modelling for beginners*. John Wiley & Sons, Ltd, (2005).
 25. Ekins, S., Mestres, J. & Testa, B., In silico pharmacology for drug discovery: Applications to targets and beyond. *Br. J. Pharmacol.*, **152**(1): 21–37 (2007).
 26. Kagoshima, M., Tomomatsu, N., Iwahisa, Y., Yamaguchi, S., Kawakami, Y. & Terasawa, M., Effects of Y-24180, a long-acting and potent antagonist to platelet-activating factor, on immediate asthmatic response in guinea pigs. *Pharmacology*, **54**(1): 1–7 (1997).
 27. Krieger, E., Koraimann, G. & Vriend, G., Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA—a self-parameterizing force field. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, **47**(3): 393–402 (2002).
 28. Schneider, G., *De novo molecular design*. John Wiley & Sons, Ltd, (2013).

29. Istyastono, E. P., Construction and optimization of structure-based virtual screening protocols to identify cyclooxygenase-1 inhibitors using open babel, spores and plants. *Indones. J. Chem. Vol 12, No 2*, (2012). doi:10.22146/ijc.21354
30. Marcou, G. & Rognan, D., Optimizing fragment and Scaffold docking by use of molecular interaction fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.*, **47(1)**: 195–207 (2007).