

Toksikolojik Araştırmalarda Alternatif Bir Organizma:

Caenorhabditis Elegans (C. Elegans)

An Alternative Organism In Toxicological Researches: *Caenorhabditis Elegans* (*C. Elegans*)

Nazmi SAVAŞ¹, Serdal ÖĞÜT¹, Abdullah OLGUN²

¹Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü

²İstinye Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

ÖZ

Son yıllarda toksik ve toksik olma potansiyeli olan maddeler artış göstermektedir. Bu toksik maddeler çevre ve halk sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bu olumsuz etkileri göstermek amacı ile birçok model organizma kullanılmaktadır. *Caenorhabditis elegans (C. elegans)* toksisite çalışmaları için kullanılan önemli model organizmalardan biridir. Bu organizmanın birçok kullanım amacı mevcuttur. Diğer model organizmalar ile karşılaştırıldığında toksikoloji çalışmalarında kullanılmasının bazı avantajları ve dezavantajları vardır. En önemli avantajlarından birisi de otomatik yüksek ölçekli taramaların yapılabilmesi sayesinde aynı anda yüzlerce hatta binlerce maddenin toksisite taramasının yapılabilmesidir. Bu derlemede *C. elegans* hakkında ve toksisite araştırmalarındaki kullanımı hakkında bilgiler verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Caenorhabditis elegans*, model organizma, toksikoloji, toksisite.

ABSTRACT

In recent years, toxic and potentially toxic substances have increased. These toxic substances affect the human health and environment in a negative way. It has been used many model organisms to show the negative effects. *Caenorhabditis elegans (C. elegans)* is one of the most important model organisms used for the toxicity studies. This organism has lots of intended purposes. When compared to the other organisms, it has some advantages and disadvantages on the use of toxicology studies. One of the most important advantages is that thanks to the automatic high-scale scans, it can be performed to scan for toxicity of hundreds or even thousands of substances at the same time. In this compilation, informations have been provided about *C. elegans* and its use in toxicity studies.

Key Words: *Caenorhabditis elegans*, model organism, toxicology, toxicity.

1. GİRİŞ

Caenorhabditis elegans (C. elegans), yaklaşık 1 mm boyunda, mikroskopik, patojen olmayan, doğada ağaç diplerinde yaşayan bir organizmadır. Laboratuvar koşullarında, petri kabı içinde bakteriyile (*Escherichia coli* OP50 suşu) beslenerek yaşamını sürdürebilen bir nematoddur (1). Bu organizma, hermafrodit ve erkek olmak üzere iki cinsiyete sahiptir (2). Erkekler populasyonun % 0.5' inden daha azını oluşturur (3). *C. elegans*'ın dört (L1-L4) larval

Sorumlu Yazar: Serdal ÖĞÜT

Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü

serdal.ogut@adu.edu.tr

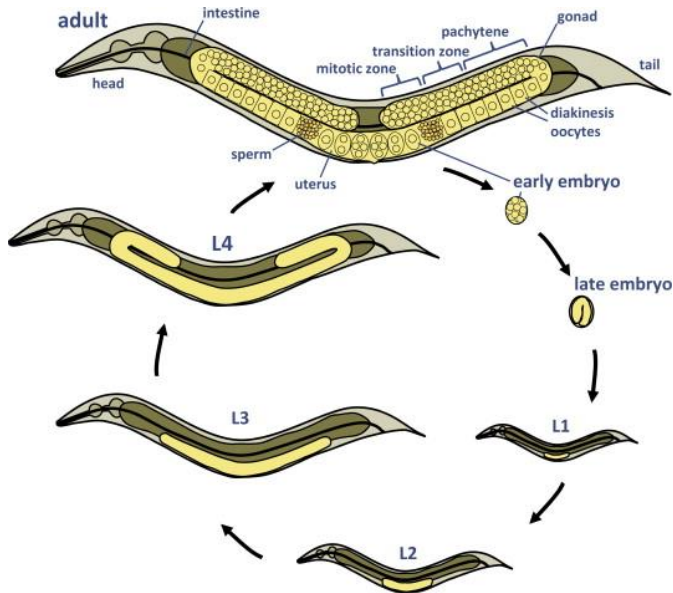
Geliş Tarihi: 04.04.2018 – Kabul Tarihi: 30.07.2018

dönemi vardır. Bu larval dönemler yaklaşık 3 gün sürmektedir. Sonra embriyo üretebilen erişkin forma gelebilmektedir. Şekil 1 'de *C. elegans*'a ait ışık mikroskobu görüntüsü verilmiştir.



Şekil 1. *C. elegans*'ın ışık mikroskobu görüntüsü.

C. elegans, uygun olmayan koşullarda (açlık, sıcaklık gibi) L1-L2 evresinden sonra L3 evresi yerine "Dauer" olarak isimlendirilen forma dönüşebilmektedir. Bu formda 4 aya dek yaşayabilir. Uygun olmayan stres koşulları ortadan kalktığında ise bu formdaki bireyler, hayat döngülerine L4 evresinden devam ederek gelişimlerini tamamlarlar (5). *C. elegans*'ın yaşam evreleri Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. *C. elegans*'ın yaşam evreleri (6).

Biyoloji alanındaki bilgilerimizin çoğu *in vivo* ve *in vitro* modeller kullanılarak bilimsel deneylere dayanmaktadır. Toksikite testleri, belirli bir modelde edinilen bilgilerin diğer biyolojik sistemlere uygulanacağı ve her bir modelin gerekli bilgilere bağlı olarak güçlü ve sınırlı yönlerinin belirlenmesi beklentisi ile yapılır. Memeli laboratuvar hayvanları, memelilerde toksikoloji konusunda mevcut ‘altın standart’ ilkesi ile, toksisite testi yapan çoğu organı insanlarla paylaşır. Bununla birlikte, hiçbir model mükemmel değildir ve insan deneyleri bile, popülasyondaki sonuçları her zaman doğru tahmin edemez (7).

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Toksikite çalışmalarında *C.elegans*

Memeli modelleri kullanılarak yapılan toksisite çalışmaları pahalı ve zaman alıcıdır (8,9) ve kemirgen modellerinin, insanlardaki spesifik toksik etkilerin yalnızca yaklaşık %50’sini öngördüğü bildirilmektedir (10,11). Birden fazla memeli türü kullanmak, tahmin oranını artırabilir ancak maliyeti de arttıracak ve verimi azaltacaktır. Toksikite çalışmalarında, memeli model organizmaların kullanımı azaltılarak, insan sonuçlarını tahmin edebilme düzeyini iyileştirmek için alternatif yöntemlerin kullanılması hedeflenmektedir.

Toksikite yollarındaki bozulmaları değerlendirmek için *in vitro* yöntemlerin kullanılması, toksik kimyasalların çok daha hızlı ve çok daha geniş konsantrasyonlarda test edilebilmesini sağlamaktadır. Birincil insan hücrelerinin kullanımı, laboratuvar hayvanlarının test edilmesine kıyasla; insanlarda spesifik metabolizma ve etki şekillerini daha doğru bir şekilde yansıtmaya potansiyeline sahiptir. Ancak elde edilen sonuçlar, mevcut teknikler kullanılarak organizma seviyesindeki bir cevabı tahmin etmek için kullanılamaz. Ek olarak, ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarını kullanarak yapılan testler, yüksek yanlış pozitif veya yanlış negatif oranlara sahiptir. Bu nedenle, tehlike değerlendirmesi için *in vitro* testlerin kullanılması, *in vivo* zararsız bileşiklerin gereksiz yere kısıtlanmasına veya zararlı bileşiklerin hatalı bir şekilde güvenli olduğunun düşünülmesine yol açabilir (12,13).

Başka bir seçenek ise, *in vitro* teknikler kolaylığında, ancak *in vivo* bir model olan nematod *C. elegans* gibi küçük bir model organizmanın kullanılmasıdır. *In vitro* testlerin aksine, *C. elegans* toksisite testleri, sağlam ve metabolik olarak aktif sindirim, üreme, endokrin, duyu ve nöromüsküler sistemler ile tam bir hayvandan veri sağlamaktadır. Birden fazla *in siliko*, *in vitro* ve memeli olmayan küçük hayvanı (*in vivo*) kullanan test stratejilerinin model tabanlı analizleri, memeliler kullanılarak yapılan *in vivo* toksisite çalışmalarında olduğu gibi risk değerlendirmesini güçlü şekilde bildirme potansiyeline sahiptir; ancak bu alanda daha fazla bilimsel çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Şimdilik, insan vücudunun maruz kalma düzeylerini tahmin etmek için memeli modelleri kullanılmaya devam edilecektir, çünkü mevcut alternatif analizlerin herhangi bir kombinasyonu, memelilerde bulunan metabolizma, homeostaz ve sinyal mekanizmalarının karmaşıklığını yansıtamamaktadır (14,15).

Bununla birlikte, mevcut toksisite verileri az olan veya hiç bulunmayan, piyasada bulunan kimyasalların yüksek yüzdesi göz önüne alındığında, toksisite potansiyeli en yüksek olanların acilen test edilmesi gerekmektedir. *In vitro* ve memeli testleri arasında bir ara basamak olarak, çeşitli *C. elegans* testleri ile elde edilen toksisite verileri ise memelilerdeki durumu başarılı bir şekilde öngörebilmektedir (7).

2.2 C. elegans Üzerinde Yapılan Bazı Toksikite Çalışmaları

Bazı şirketler ve devlet kurumları hızlı toksisite değerlendirmeleri için *C. elegans*'ı kullanmaya başlamışlardır. Etik kurul gerektirmeyen çalışma imkânı, hızlı etkin çözümler sunması *C. elegans*'ı toksikolojik çalışmalar için değerli bir model organizma yapmaktadır (16).

C. elegans üzerinde farklı toksik maddeler ile birçok araştırma yapılmıştır. Ancak bu konudaki çalışmaların artırılması da birçok konuya ışık tutması açısından önemlidir.

Bisfenol A (BPA) maddesinin L4 evresindeki *C. elegans* üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, uzun süreli BPA maruziyetinin olumsuz moleküler ve fizyolojik etkileri gösterilmiştir. BPA'nın 0.228 mg/L dozda uygulanmasının bile *C. elegans* üzerinde toksik olduğu belirlenmiştir (17).

C. elegans'ın canlılık açısından ayrı ayrı gözlenip değerlendirildiği 21 kimyasallı bir taramada, *C. elegans*'daki ve fareler üzerindeki LD₅₀ sıralamasında, ancak yalnızca pH değerini 3.2'nin altına düşüren üç bileşik ayrı tutulduğunda, LD₅₀'nin sıçanlarda eşit derecede değerlendirileceği tahmin edilmiştir (18).

Organofosfatlı pestisitlerin toksik etkilerini incelemek amacı ile yapılan bir çalışmada *C. elegans*'daki EC₅₀ değerlerinin sıralaması, sıçan LD₅₀'lerin sıralaması ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aynı çalışmada, memelilerde kolinesterazı inhibe ettiği bilinen altı organofosfat böcek ilacından beşi de inhibe edilmiştir. *C. elegans*'taki kolinesteraz aktivitesi, toksisite mekanizmasının korunduğu anlamına gelmektedir (19).

Etil ve metil parabenin yumurta verimi, yaşama yüzdesi ve fiziksel büyüme üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada da *C. elegans* kullanılmıştır. Yapılan istatistik analiz sonuçlarına göre etil ve metil paraben uygulanan gruplarda yumurta verimi, kontrol grubuna göre azalmıştır. Yine bu maddeler uygulanan gruplarda kontrole göre büyümenin baskılandığı belirlenmiştir (20).

Antimikrobiyal aktiviteye sahip bileşikleri tanımlamak için, insan patojenleriyle önceden enfekte *C. elegans* kullanılarak potansiyel ilaçların taranması gerçekleştirilmiştir (21,22).

Kadmiyum ve toksik lektinlere rağmen, memeliler ve *C. elegans* bağırsak dismorfolojisi benzer bulunmuştur. Ancak, memelilerin aksine, bağırsak toksinlerinin yol açtığı hasar, canlı solucanlarda ışık mikroskobu veya COPAS tespiti ile görüntülenebilmektedir (23,24).

2.3. C. elegans'ın Bir Toksikoloji Modeli Olarak Kullanılma Nedenleri

C. elegans başta yaşlılık ve genetik çalışmaları olmak üzere birçok alanda tercih edilen bir model organizmadır. Toksikolojik araştırmalarda da bu organizmanın tercih edilmesinin birçok nedeni vardır. Bu nedenlerden ilki birçok bakımdan memelilerle benzerlik göstermesidir (2).

Nöronal fonksiyonun pek çok elementinin korunmuş olması da akut ve kronik toksisite çalışmaları için *C. elegans*'ı popüler hale getirmektedir. Beslenme özellikleri *C. elegans*'ı iyi bir oral toksisite modeli yapar. Doku kültürlerinden farklı olarak, *C. elegans* nöronal, motor, sindirim ve üreme sistemlerine, uyarılara, endokrin sinyal ve duyu / davranış tepkilerine sahiptir. *C. elegans*, nispeten basit teknikler kullanılarak ve CO₂ inkübatörlerine ihtiyaç olmadan 15 ila 25 °C'de muhafaza edilebilir (25-27).

Yine de bazı çalışmalar için model olarak *C. elegans* kullanımı mümkün olmayabilir. *C. elegans*, gözler, akciğerler, kalp, böbrekler ve karaciğer gibi birçok memeli organına sahip değildir. Organ toksisite çalışmaları için bu organizma uygun olmayabilir. Bu organizmanın pH aralığının sınırlı olması, kazanılmış bir bağışıklık sisteminin olmaması, iyi bir absorpsiyon modeli olmaması bazı araştırmaların *C. elegans* ile yapılmasına olanak vermemektedir (7, 28-30).

2.4 Yüksek Ölçekli Toksikite Taramaları

Elektrofizyolojik çip kayıtları, lazer aksotomi, otomatik analiz algoritmaları, tersinir solucan immobilizasyonu ve yüksek çözünürlüklü görüntüleme teknikleri gibi çeşitli farklı teknolojiler, yüksek ölçekli toksisite taramalarında kullanılan önemli tekniklerdendir. Gelişimsel ve davranışsal analizler için de çeşitli araçlar ve farklı fenotiplere dayanan solucan sınıflandırma yöntemleri kullanılmaktadır. Mikroakışkan bazlı sistemlerle de bu teknikler *C. elegans* nematodu kullanılarak, mikroakışkan cihazlar ile de desteklenmektedir. Böylece solucanların davranışları, embriyo seçimi, yaş senkronizasyonu gözlemi, tersinir solucan immobilizasyonu, görüntüleme ve ilaçla maruz kalma aşamaları arasında değişen ana protokoller uygulandığında, üstün performans sağlanarak solucan tabanlı araştırmanın birçok yönünü önemli ölçüde geliştirme potansiyeli göstermektedir. Mikro akışkan çiplerde tekli hayvanları manipüle etme yeteneği, yeni fenotipleme yollarının önünü açmıştır. Bu sayede, gelişim, yaşlanma, yaşam süresi, davranış ve motilite gibi alanlarda farklı çalışmalar da hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (31).

Uluslararası çeşitli kurum ve kuruluşlar ise; yeterli toksisite verisine sahip olmayan çok sayıda farklı kimyasal değerlendirmek ve test etmek için alternatif model organizmaları kullanıp yüksek ölçekli toksisite tarama testlerini geliştirmektedirler. Alternatif model organizmaları kullanırken de her sistemin avantajlarıyla birlikte dezavantajlarını göz önünde bulundurmaları gerektiğinin de altını çizmektedirler. *C. elegans* reproduksiyon analizi hızlı olmakla birlikte tekrarlanabilir ve çok çeşitli kimyasallar için farklı sonuçlar bu analiz türünde gözlemlenebilmektedir. Reproduksiyon; tuz konsantrasyonu, gıdanın mevcudiyeti gibi bir dizi çevresel koşuldaki etkilenmektedir. Etanol, kadmiyum gibi çeşitli metaller, Enterobacteriaceae, antihelmintik ajanlar, nikotinik agonistlere maruz kalma ve deney kimyasallarının varlığı da üremeyi etkilemektedir. Bu yüzden çok çeşitli, potansiyel toksik maddeler *C. elegans*'ın üremesini etkilemekte, HTS çalışmaları için biyomedikal çalışmalarda umut vadeden bir durum da sergilemektedirler. Gelecekte ise *C. elegans*'ın birçok farklı toksik maddelere maruziyeti sonucunda ortaya çıkacak çeşitli sonuçların, diğer türlerle ve *in vitro* HTS-HCS analizlerinde gözlemlenecek sonuçlarla çok daha tutarlı ve ilişkili yanıtlar verebilmesi amaçlanmaktadır (32).

3. SONUÇ

Geleneksel laboratuvar hayvanlarını kullanarak toksikoloji çalışmaları için halen kabul gören standartlar, süre ve maliyetin yanı sıra tür özgüllüğü açısından da tartışmalıdır. Yeni tahlilleri ve toksisite değerlendirme stratejilerini test etmek ve doğrulamak için, daha uygun fiyatlı ve hızlı olan toksisite testlerine ihtiyaç duyulmuş olup bu da çeşitli, koordineli ulusal ve uluslararası çabalara yol açmıştır. *C. elegans* çalışmalarından tutarlı sonuçlar elde etmek için, standartlaştırılmış kültür uygulamalarına ihtiyaç duyulmasına rağmen, *in vitro* işleme teknikleri

ve maliyet oranları tutarlı, sağlam bir organizmadan elde edilen oral toksisite testi verileri birleştirilerek, in vitro testler ve memeli toksisite testleri arasında da bir köprü kurulabilmektedir. Ancak bu organizma ile bazı toksikoloji çalışmalarının gerçekleştirilemeyeceği de (birçok memeli organına sahip değil) unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Ünlü E. Deri yařlanmasında korunma ve tedavi yöntemleri. *Dermatoz 1*, 2010; (1): 23-31.
2. Brenner S. The genetics of *C. elegans*. *Genetics*, 1973; (77): 71-94.
3. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer JB, Priess JR, “ *C. elegans* II, 2nd edition”, *Cold Spring Harbor Monograph Series*, 2010; 33.
4. Horvitz HR. A nematode as a model organism: the genetics of programmed death [Film]. *Cogito Learning Media*, Inc. Available: <http://www.cogitomedia.com> [1999, Jul 20].
5. www.wormatlas.org
6. www.wormclassroom.org
7. Hunt PR. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J. Appl. Toxicol.*, 2017; 37: 50–59.
8. Nass R, Hamza I. The nematode *C. elegans* as an animal model to explore toxicology in vivo: solid and axenic growth culture conditions and compound exposure parameters. *Curr. Protoc. Toxicol.*, Chapter 1: 2007; Unit1 9, doi: 10.1002/0471140856.tx0109s31.
9. Tralau T, Riebeling C, Pirow R, Oelgeschlager M, Seiler A, Liebsch M, Luch A. Wind of change challenges toxicological regulators. *Environ. Health Perspect.* 2012; 120: 1489–1494.
10. Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature*, 2009; 460: 208–212.
11. Knight AW, Little S, Houck K, Dix D, Judson R, Richard A, McCarroll N, Akerman G, Yang C, Birrell L, Walmsley RM. Evaluation of highthroughput genotoxicity assays used in profiling the US EPA ToxCast chemicals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2009; 55: 188–199.
12. Miranda JP, Leite SB, Muller-Vieira U, Rodrigues A, Carrondo MJ, Alves PM. Towards an extended functional hepatocyte in vitro culture. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2009; 15: 157–167.
13. Scott CW, Peters MF, Dragan YP. Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing. *Toxicol. Lett.*, 2013; 219: 49–58.
14. Tice RR, Austin CP, Kavlock RJ, Bucher JR. Improving the human hazard characterization of chemicals: a Tox21 update. *Environ. Health Perspect.* 2013; 121: 756–765.
15. Casey W, Jacobs A, Maull E, Matheson J, Clarke C, Lowit A. A new path forward: the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and National Toxicology Program’s Interagency Center for the Evaluation

- of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 2015; 54: 170–173.
16. NTP. West Virginia Chemical Spill: NTP Studies and Results. *National Toxicology Program*. <http://ntp.niehs.nih.gov/results/areas/wvspill/studies/index.html> [accessed 4 June 2015].
 17. Dong Zhou, Jie Yang, Hui Li , Changzheng Cui, Yunjiang Yu, Yongdi Liu, Kuangfei Lin. The chronic toxicity of bisphenol A to *Caenorhabditis elegans* after long-term exposure at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere*, 2016; 154, 546-551.
 18. Li Y, Gao S, Jing H, Qi L, Ning J, Tan Z, Yang K, Zhao C, Ma L, Li G. Correlation of chemical acute toxicity between the nematode and the rodent. *Toxicol. Res.*, 2013; 2: 403–412.
 19. Cole RD, Anderson GL, Williams PL. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model of organophosphate-induced mammalian neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004; 194: 248.
 20. Piriç B, Türkoğlu Ş. Etil Paraben ve Metil Parabenin *Caenorhabditis Elegans*'ta Yumurta Verimi, Yaşama Yüzdesi ve Fiziksel Büyüme Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi (CFD)*, 2016; Cilt 37, No. 4.
 21. Moy TI, Conery AL, Larkins-Ford J, Wu G, Mazitschek R, Casadei G, Lewis K, Carpenter AE, Ausubel FM. High-throughput screen for novel antimicrobials using a whole animal infection model. *ACS Chem. Biol.*, 2009; 4: 527–533.
 22. Lakshmanan U, Yap A, Fulwood J, Yichun L, Hoon SS, Lim J, Ting A, Sem XH, Kreisberg JF, Tan P, Tan G, Flotow H. Establishment of a novel whole animal HTS technology platform for melioidosis drug discovery. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2014; 17: 790–803.
 23. Stutz K, Kaech A, Aebi M, Kunzler M, Hengartner MO. Disruption of the *C. elegans* Intestinal Brush Border by the Fungal Lectin CCL₂ Phenocopies Dietary Lectin Toxicity in Mammals. *PLoS One*, 2015; 10: e0129381.
 24. Maxwell C.K. Leung, Phillip L. Williams, Alexandre Benedetto, Catherine Au, ‡Kirsten J. Helmcke, Michael Aschner, and Joel N. Meyer. *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. *Toxicological Sciences*, 2008; 106(1), 5–28.
 25. Anderson GL, Cole RD, Williams PL. Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2004; 23: 1235–1240.
 26. Bergin IL, Wilding LA, Morishita M, Walacavage K, Ault AP, Axson JL, Stark DI, Hashway SA, Capracotta SS, Leroueil PR, Maynard AD, Philbert MA. Effects of particle size and coating on toxicologic parameters, fecal elimination kinetics and tissue distribution of acutely ingested silver nanoparticles in a mouse model. *Nanotoxicology*, 2016; 10: 352-360.

27. Boyd WA, McBride SJ, Rice JR, Snyder DW, Freedman JH. A highthroughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010; 245: 153–159.
28. Dhawan R, Dusenbery DB, Williams PL. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 1999; 58: 451–462.
29. Hunt PR, Olejnik N, Sprando RL. Toxicity ranking of heavy metals with screening method using adult *Caenorhabditis elegans* and propidium iodidereplicatestoxicityrankinginrat. *Food Chem. Toxicol.*, 2012; 50: 3280–3290.
30. Leung MCK, Williams PL, Benedetto A, Au C, Helmcke KJ, Aschner M, Meyer JN. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol. Sci.*, 2008; 106: 5 –28.
31. Boyd WA, McBride SJ, Rice JR, Snyder DW, Freedman JH. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction essay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010; 245: 153-159.
32. Cornaglia M, Lehnert T, Gijss MAM. Microfluidic systems for high-throughput and high-content screening using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Roy. Soc. Chem.*, 2017; DOI: 10.1039/C7LC00509A.