

INFLUENCE DU PARACETAMOL A DOSE THERAPEUTIQUE SUR LES MARQUEURS HEPATIQUES (TRANSAMINASES et GAMMA-GT)

INFLUENCE OF THERAPEUTIC PARACETAMOL ON HEPATIC MARKERS (TRANSAMINASES and GAMMA-GT)



| Arold Fazili ^{1*} | Armand ABASI ¹ | Nadege TSHIWIZA ¹ | Justin KABUAKA ² | et | Edouard Tshibumbu ³ |

¹. Institut supérieur des techniques médicales de Likasi | Département de laboratoire | Unité de Biochimie | RDC |

². Université de Lubumbashi | Faculté des Sciences Pharmaceutiques | département de Pharmacie Hospitalière | RDC |

³. Université de Lubumbashi | Faculté de Médecine | département des Sciences Biomédicales | RDC |

| Received February 21 2022 |

| Accepted March 23, 2022 |

| Published April 01, 2022 |

| ID Article | Fazili-Ref4-3-16ajiras210323 |

RESUME

Introduction : Le paracétamol est actuellement un traitement symptomatique antalgique et antipyrétique de référence, utilisé seul ou en association. Autrement appelé acétaminophène, acétyl-p-aminophénol ou encore 4-hydroxy-acétanilide, le paracétamol possède des voies métaboliques et des mécanismes d'action encore incomplètement compris. **Objectif :** L'objectif de notre étude est de faire une exploration hépatique par la mesure des activités des transaminases et de la Gamma GT après consommation du paracétamol à dose thérapeutique pour évaluer la toxicité. **Méthodes :** Nous avons sélectionné 300 personnes vivant dans la ville de Likasi et dont l'âge variait entre 2 ans à 53 ans dont 110 Personnes étaient de sexe masculin et 190 Personnes étaient de sexe féminin ; ces sujets résidaient à Likasi, et du sang veineux a été prélevé sur chacun d'eux. **Résultats :** L'activité enzymatique de la G-GT obtenue chez les sujets après prise du paracétamol est de 48.83 ± 7.80 U/L. cette activité enzymatique est significativement plus élevée ($P < 0,05$) que l'activité enzymatique de 20.09 ± 5.55 U/L et U/L obtenue chez les sujets avant prise du paracétamol. L'activité enzymatique de la TGO obtenue chez les sujets après prise du paracétamol est de 47.95 ± 8.80 U/L. cette activité enzymatique est significativement plus élevée ($P < 0,05$) que l'activité enzymatique de 18.51 ± 4.09 U/L et U/L obtenue chez les sujets avant prise du paracétamol. L'activité enzymatique de la TGP obtenue chez les sujets après prise du paracétamol est de 45.64 ± 7.22 U/L. cette activité enzymatique est significativement plus élevée ($P < 0,05$) que l'activité enzymatique de 17.39 ± 8.07 U/L obtenue chez les sujets avant prise du paracétamol. **Conclusion :** Nous en avons conclu que la prise du paracétamol exposerait à des perturbations enzymatiques de la Gamma-GT, la GOT et la GPT donnant lieu à la longue à une cytolyséhépatique, qui se caractérise par l'augmentation des enzymes hépatiques.

Mots clés : Paracétamol-GT, TGO, TGP, Likasi.

ABSTRACT

Introduction: Paracetamol is currently a benchmark symptomatic analgesic and antipyretic treatment, used alone or in combination. Otherwise called acetaminophen, acetyl-p-aminophenol or even 4-hydroxy-acetanilide, paracetamol has metabolic pathways and mechanisms of action that are still incompletely understood. **Objective:** The objective of our study is to perform liver exploration by measuring the activities of transaminases and Gamma GT after consumption of paracetamol at a therapeutic dose to assess toxicity. **Methods:** We selected 300 people living in the city of Likasi and whose age varied between 2 years and 53 years of which 110 people were male and 190 people were female; these subjects resided in Likasi, and venous blood was taken from each of them. **Results:** The enzymatic activity of G-GT obtained in subjects after taking paracetamol is 48.83 ± 7.80 U/L. this enzymatic activity is significantly higher ($P < 0.05$) than the enzymatic activity of 20.09 ± 5.55 U/L and U/L obtained in the subjects before taking paracetamol. The enzymatic activity of the TGO obtained in subjects after taking paracetamol is 47.95 ± 8.80 U/L. this enzymatic activity is significantly higher ($P < 0.05$) than the enzymatic activity of 18.51 ± 4.09 U/L and U/L obtained in the subjects before taking paracetamol. The enzymatic activity of the TGP obtained in subjects after taking paracetamol is 45.64 ± 7.22 U/L. this enzymatic activity is significantly higher ($P < 0.05$) than the enzymatic activity of 17.39 ± 8.07 U/L obtained in the subjects before taking paracetamol. **Conclusion:** We concluded that taking paracetamol would expose to enzymatic disturbances of Gamma-GT, GOT and GPT giving rise to long-term hepatic cytolysis, which is characterized by an increase in hepatic enzymes.

Keywords: Paracetamol-GT, TGO, TGP, Likasi.

1. INTRODUCTION

Le paracétamol est actuellement un traitement symptomatique antalgique et antipyrétique de référence, utilisé seul ou en association. Autrement appelé acétaminophène, acétyl-p-aminophénol ou encore 4-hydroxy-acétanilide, le paracétamol possède des voies métaboliques et des mécanismes d'action encore incomplètement compris. En dehors de sa principale contre-indication, l'insuffisance hépatocellulaire, ce traitement bénéficie longtemps une molécule réputée pour son innocuité aux posologies habituelles [1]. Plusieurs cas cliniques rapportent ainsi d'authentiques cas de défaillances hépatocellulaires pour des posologies de paracétamol très inférieures à celles réputées toxiques. L'analyse des circonstances de survenue des cas d'hépatotoxicité, corrélée aux données physiopathologiques expérimentales, a permis d'identifier certains facteurs favorisant, tels l'éthylisme chronique, la dénutrition ou certains inducteurs enzymatiques [1]. La mesure de l'activité des différentes enzymes du sérum humain a pris depuis quelques

années une grande importance. Ces enzymes se trouvent normalement dans le sérum en faible quantité et à des taux bien déterminés [2]. Dès qu'un organe ou un tissu est lésé, il libère dans la circulation générale des enzymes qui lui sont propres. Par exemple, pour déterminer l'organe lésé au lieu de faire une biopsie d'organe il est beaucoup plus facile et confortable pour le malade d'effectuer une prise de sang [3]. Les enzymes ou ferments ou diastases sont des catalyseurs de nature protéique produit par un organisme vivant. Les catalyseurs sont des substances qui affectent la vitesse d'une réaction (la vitesse augmente en général de 10^8 à 10^{11} fois) mais non ses produits finaux, Ils se retrouvent donc intacts à la fin de la réaction et agissent à très petites doses [4]. Les enzymes sont de deux types : Holoprotéiques lorsqu'elles sont constituées exclusivement des acides aminés et Héteroprotéiques lorsqu'elles associent une protéine (ou apoenzyme) et une structure non protéinique (ou coenzyme) [5].

La gamma-glutamyl-transpeptidase sert au transport membranaire du radical glutamyl mais aussi d'autres aminoacides [6]. Elle est localisée dans la membrane plasmique des cellules des tubules rénaux et des canalicules biliaires ainsi que dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes [7]. Les GT augmentent chez tout individu qui absorbe de l'alcool en quantité. La prise d'alcool peut entraîner une hépatite toxique anictérique avec augmentation de la GT. Dans les cirrhoses d'origine éthylique, l'augmentation des GT est très importante. Le retour à la normale est assez rapide dès l'arrêt de la prise d'alcool chez un sujet non stéatosique, alors que chez le cirrhotique les valeurs baissent mais ne reviennent pas tout à fait à la normale.

Le processus combiné de désamination et d'amination dans lequel le groupe amine d'un acide aminé est transféré d'une façon réversible à un acide α -cétonique et le groupe α -cétonique à l'acide aminé s'appelle "TRANSAMINATION". Une enzyme qui catalyse cette réaction est appelée "TRANSAMINASE" ou "AMINOPHERASE" [8]. Les transaminases sont un groupe d'enzymes qui catalysent le transfert réversible du groupe aminé-NH₂ sur les acides cétoniques. La TGO est essentiellement présente dans le cœur, mais on la trouve aussi dans le foie, le rein et les muscles alors que la TGP est essentiellement présente dans le foie mais on la trouve aussi dans le cœur et les reins. En conséquence, la TGO augmente principalement dans les maladies cardiaques tandis que la TGP augmente principalement dans les maladies hépatiques [6, 9]. Les enzymes étant de nature protéique, sont peu stables, mais ont une spécificité d'action due à l'affinité que chaque enzyme a pour son substrat, contrairement aux catalyseurs qui ne sont pas spécifiques. Cette affinité conditionne l'évolution de la réaction catalysée par l'enzyme [8].

La mesure de l'activité des transaminases est très utile pour le diagnostic de l'infarctus du myocarde. L'évaluation de la TGO y est la plus importante. Mais, bien que la TGP ait un rôle moins grand puisque d'origine principalement hépatique, une augmentation de la TGP et de la TGO donne une indication du degré de l'atteinte hépatique éventuelle, pouvant être consécutive à une insuffisance cardiaque post-infarctus. Lors d'un infarctus du myocarde, l'augmentation de la TGO commence à la 6^e heure, se poursuit jusqu'à la 36^e heure et retourne à la normale au bout de 5 à 6 jours. On trouve également une augmentation des TGO dans les embolies pulmonaires et les infarctus rénaux [6]. Dans les affections hépatiques, la demande d'analyse n'est pas limitée à une transaminase mais aux deux, TGO et TGP. Dans les hépatites aiguës, l'augmentation des TGO mais surtout des TGP commence avant même que l'ictère ne soit déclaré. L'augmentation du taux des TGP signe en effet une cytolyse hépatique qui permet de suivre l'évolution de la maladie et une rechute éventuelle [10]. L'augmentation des transaminases est le seul signe biologique des hépatites anictériques. Dans les hépatites chroniques, l'augmentation des transaminases est modérée, elle traduit l'atteinte parenchymateuse par nécrose cellulaire. Les obstructions des voies biliaires provoquent une augmentation modérée des transaminases. Le retour à la normale est rapide [6]. L'objectif de notre étude est de faire une exploration hépatique par la mesure des activités des transaminases et de la Gamma GT après consommation du paracétamol à dose thérapeutique pour évaluer la toxicité à Likasi.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Cadre de recherche

Le laboratoire Médical Dee Service de Lubumbashi a été choisi comme lieu d'expérimentation. Likasi se trouve au cœur de la région minière du Haut Katanga, à proximité des montagnes de Mitumba et Kundelungu. Situé sur le plateau du Haut Katanga, Likasi a un climat tropical doux et la température moyenne est de 20°C. La ville est pleine des collines avec une altitude en moyenne de 1265 m et des isohypses à 1100 et 1400 m [11].

2.2 Sujets d'étude

Nous avons sélectionné 300 personnes vivant dans la ville de Likasi et dont l'âge variait entre 2 ans à 53 ans parmi lesquels 110 personnes étaient de sexe masculin et 190 personnes étaient de sexe féminin résidant à Likasi.

2.3 Les critères d'exclusion étaient :

- Toutes personnes n'ayant pas donné son consentement,
- Les anémiques,
- Les alcooliques,
- Les fumeurs,
- Toutes personnes souffrant des maladies cardiaques ou hépatiques,
- Toutes personnes n'habitant pas dans la ville de Likasi,

La sélection a été faite sans distinction des tribus, de classe social et de race.

2.4 Matériel utilisé

- Spectrophotomètre,
- Frigo,
- Centrifugeuse,
- Bain Marie,
- Portoirs,
- Pipettes,
- Micropipettes,
- Cuvettes,
- Tubes à Essai,
- Seringues, Aiguilles stériles,
- Garrot,
- Ouate.

2.4 Méthodes.

2.4.1 Prélèvements et traitement des échantillons

Le prélèvement du sang s'est effectué le matin entre 8h00 et 10h00 chez les sujets à jeun et au repos. Le sang a été recueilli dans les tubes à essai sans anticoagulant, les échantillons ont été centrifugés à 2500 tours par minute pendant 10 minutes pour avoir le sérum qui était recueilli et gardé à 4°C jusqu'au moment des analyses qui se faisaient le même jour.

2.4.2 Analyses de laboratoire.

La mesure de l'activité enzymatique de la gamma-glutamyl-transférase (γ -GT) a été effectuée par le test cinétique au 'Carboxy substrate' telle que décrite par Gendler et al., (1984) [12]. Le principe de la méthode est : le L- γ -glutamyl-3carboxy-p-nitroanilide et la glycyglycine réagissent dans une réaction catalysée par la gamma-glutamyl-transférase, on obtient le L- γ - glutamylglycine et le 5-amino-2-nitrobenzoate. La vitesse de la formation de ce dernier est déterminée photométriquement et est directement proportionnelle à la concentration catalytique de γ -GT dans l'échantillon [2].

La mesure de l'activité enzymatique de la transaminase glutamo-oxaloacétique (TGO ou GOT) a été effectuée par le test cinétique selon la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) telle que décrite par Murray (1984) [13]. Le principe de la méthode est : l' α - céto glutarate réagit avec l'aspartate dans une réaction catalysée par la transaminase glutamo-oxaloacétique. On obtient le glutamate et l'oxalacétate. Ce dernier est attaqué par la malate déshydrogénase en présence du nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD⁺) pour donner le malate et le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH). La vitesse de consommation de NADH est déterminée photométriquement et est directement proportionnelle à l'activité de GOT dans l'échantillon [2].

La mesure de l'activité enzymatique de la transaminase glutamo-pyruvique (TGP ou GPT) a été effectuée par le test cinétique selon la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) telle que décrite par Murray (1984) [14]. Le principe de la méthode est le suivant: l' α - céto glutarate réagit avec la L-alanine dans une réaction catalysée par la transaminase glutamo- pyruvique. On obtient le glutamate et le pyruvate. Celui-ci est attaqué par la malate déshydrogénase en présence du nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD⁺) pour donner le lactate et le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH). La vitesse de consommation de NADH est déterminée photométriquement et est directement proportionnelle à l'activité de GPT dans l'échantillon [2]. Toutes ces méthodes sont recommandées par la fédération internationale de chimie clinique (IFCC) [15].

2.4.3 Analyse statistique

Les résultats moyens des différents paramètres obtenus chez les 300 sujets avant et après prise du paracétamol ont été comparés à l'aide du test-t de Student. La signification statistique a été déclarée au seuil de $P < 0,05$.

3. RESULTATS

Tableau 1 : Le tableau montre les Caractéristiques de la population étudiée.

| Caractéristiques | Ni | % |
|------------------|------------|-------|
| Masculin | 110 | 36.66 |
| Féminin | 190 | 63.33 |
| Age | 2 à 53 ans | - |

Les résultats moyens de différents paramètres (G-GT, GOT, GPT) obtenus chez les 300 sujets avant et après prise du paracétamol sont consignés dans le tableau 1.

Tableau 2 : Le tableau montre les valeurs moyennes de la G-GT, de la TGO et de la TGP obtenues chez les sujets avant et après prise du paracétamol

| Marqueurs Hépatiques | Sujets avant prise du paracétamol N(300) | Sujets après prise du paracétamol N(300) | Valeur de P | I.C à 95% |
|----------------------|--|--|-------------|-----------------|
| G-GT (U/L) | 20,09 ± 5,55 | 48,83 ± 7,80 | P < 0,0001 | 27,658 à 29,822 |
| TGO (U/L) | 18,51 ± 4,09 | 47,95 ± 8,80 | P < 0,0001 | 8,344 à 30,536 |
| TGP (U/L) | 17,39 ± 8,07 | 45,64 ± 7,22 | P < 0,0001 | 27,03 to 29,47 |

G-G T: Gamma-glutamyl transférase **TGO**: Transaminase; oxalo-acétique **TGP**: Transaminase glutamo-pyruvique ; **I.C** : interval de confiance.

L'examen du tableau I et l'utilisation du test t Student ont abouti aux observations suivantes :

- L'activité enzymatique de la G-GT obtenue chez les sujets après prise du paracétamol est de 48.83 ± 7.80 U/L. cette activité enzymatique est significativement plus élevée (P< 0,05) que l'activité enzymatique de 20.09 ± 5.55U/L et U/L obtenue chez les sujetsavant prise du paracétamol.
- L'activité enzymatique de la TGO obtenue chez les sujets après prise du paracétamol est de 47.95 ± 8.80 U/L. cette activité enzymatique est significativement plus élevée (P<0,05) que l'activité enzymatique de 18.51 ± 4.09 U/L et U/L obtenue chez les sujets avant prise du paracétamol.
- L'activité enzymatique de la TGP obtenue chez les sujets après prise du paracétamol estde 45.64 ± 7.22 U/L. cette activité enzymatique est significativement plus élevée (P< 0,05) que l'activité enzymatique de 17.39 ± 8.07 U/L obtenue chez les sujets avant prise du paracétamol.

4. DISCUSSION

Le paracétamol est l'un des médicaments les plus vendus au monde à la fois pour son effetantalgique mais aussi pour son effet antipyrétique. Les intoxications médicamenteuses restent un problème de santé publique. Le paracétamol serait la 2ème molécule la plus retrouvée dans les intoxications après les benzodiazépines. Sa fréquence est d'autant plus élevée qu'il est accessible rapidement et disponible sans ordonnance. Le problème réside dansle fait qu'en cas de surdosage ou de prise volontaire abusive, le paracétamol peut entraîner deslésions hépatiques sévères voire mortelles [16]. La gamma-glutamyl-transpetidase sert au transport membranaire du radical glutamyl mais aussi d'autres aminoacides [6]. Elle est localisée dans la membrane plasmique des cellules des tubules rénaux et des canalicules biliaires ainsi que dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes [7]. Les transaminases sont un groupe d'enzymes qui catalysent le transfert réversible du groupe aminé-NH₂ sur les acides cétoniques. La TGO est essentiellement présente dans le cœur, maison la trouve aussi dans le foie, le rein et les muscles alors que la TGP est essentiellement présente dans le foie mais on le trouve aussi dans le cœur et les reins. En conséquence, la TGO augmente principalement dans les maladies cardiaques tandis que la TGP augmente principalement dans les maladies hépatiques [6, 9]. Ainsi, la métabolisation du paracétamol excédentaire se fait par la voie du cytochrome P450, ce qui aboutit inévitablement à la formation de NAPQI (N- acetyl- pbenzoquinone-imine). Ce composé toxique, produits dans des quantités trop importantes, va bientôt utiliser tous les stocks de glutathion de l'organisme. Le procédé de détoxification une fois dépassée, le NAQPI va s'accumuler dans l'organisme, et sa toxicité hépatique se fera sousla forme d'une cytolysé hépatique, par atteinte mitochondriale principalement [17]. Le temps de demi-vie plasmatique du paracétamol est rapide de 2h à 2h30 aux doses thérapeutiques. La demi-vie augmente lors d'intoxication au paracétamol avec une concentration maximale atteinte 4h après l'ingestion. La liaison aux protéines plasmatiques est relativement faible de 10 à 25% à des concentrations thérapeutiques et est de 8 à 43 % à des concentrations toxiques. Cette capacité de fixation peut avoir une incidence lors d'une intoxication poly médicamenteuse ou d'un traitement en cours, en augmentant la fraction libred'un produit se liant fortement aux protéines plasmatiques. Le volume de distribution est de l'ordre de 1L/kg à des doses thérapeutiques [17].

A doses thérapeutiques, le NAPQI produit à raison de 7% de la dose de paracétamol ingérée,est facilement neutralisé par le biais de sa conjugaison au glutathion disponible au niveau dufoie. Par conséquent, ses liaisons aux protéines intracellulaires sont limitées et leurs conséquences amorties [18]. A doses toxiques, les quantités de glutathion disponibles ne sont plus suffisantes relativementaux quantités de NAPQI produites du fait d'importantes quantités de paracétamol dans le foiemais aussi du fait de l'induction des mono-oxygénases à CYP-2E1. Il s'en suit donc une accumulation de ce métabolite au niveau du foie et ses effets néfastes pour cet organe deviennent proportionnellement perceptibles et de plus en plus importants [19]. Ces observations permettent de comprendre nos résultats.

5. CONCLUSION

L'étude montre que le paracétamol a un effet significatif sur l'augmentation de la G-GT, la TGO et laTGP. L'étude montre que la prise du paracétamol exposerait à des perturbations enzymatiques de la Gamma-GT, la GOT et la GPT qui peut engendrer une cytolyséhépatique caractérisée par l'augmentation des enzymes hépatiques.

6. REFERENCES

1. Wolf S.J., Heard K., Sloan E.P., and Jagoda A.S. American College of emergencyphysicians. Clinical policy: critical issues in the management of patients presentingto the emergency department with acetaminophen overdose. *Ann Emerg Med.* 2005;50: 292–313.
2. Dominique B., Laurent, B., Edith, B. Corbel. Explorations en Biochimie médicale : Cas cliniques, interprétations et orientations diagnostiques, Tome 2, Lavoisier Médecine, Paris, 2021.

3. Christian M. Biochimie et biologie moléculaire, PASS-LAS, De Boeck supérieur, Paris, 2020.
4. Jacques Henry, W. Biochimie Générale, Dunod, Paris, 2020.
5. Stryer L, Berg Jm, Tymoczko JL. Biochimie, Médecine science, Flammarion, Paris, 2007.
6. Valdiguié P. Biochimie Clinique, Université Paul Sébastien, Toulouse, 2000.
7. Murray R.K., Bender D.A., Botham K.M., Kennedy P.J., Rodwell V.W., Weil P.A. Biochimie de Harper. De Boeck, Nouveaux Horizons, Paris 2013.
8. Wheinin S. Toute la Biochimie, Dunod, Paris, 2004.
9. Ndibualonji B.B.V., Kabongo Tsh., Meta L. Exploration des fonctions hépatiques chez les enfants de la rue de Lubumbashi qui se droguent en inhalant un mélange de colle et d'essence. *Rev. méd. Gds.* 2017 ; 18(1) : 56-60.
10. Charlotte, P et Kath Leen , C. Biochimie, De Boeck Supérieur, Paris, 2019.
11. Jean Omasombo Tshonda : Haut-katanga, Tome 2, p.28, 2018, Musée royal de l'Afrique Central-Tervuren.
12. Gendler S., Y-GT. Kaplan A et al. (eds), The C.V. Mosby CO, St Louis, Toronto, Princeton, *Clin. Chem.* 1984; 1220-1123.
13. Murray R. Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al. (eds), The C.V. Mosby CO, St Louis, Toronto, Princeton, *Clin. Chem.* 1984; 1112-1116.
14. Murray R. Alanine aminotransferase. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby CO. St Louis. Toronto. Princeton.* 1984; 1088-1090).
15. Bossuyt X. Et Boynaems, J. Répères en diagnostic de laboratoire, Garant, Louvain, 2001.
16. Gray T., Hoffman R. Bateman D., Intravenous paracétamol an international perspective of toxicity. *Clin Toxicol (Phila).* 2011; (49): 150-152.
17. Ali Fm, Boyer Ew, Bird SB. Estimated risk of hepatotoxicity after an acute acetaminophen overdose in alcoholics. *Alcohol.* 2008; 42:213-8.
18. Hinson Ja, Roberts Dw, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;(196):369-405.
19. Dart R.C., Erdman A.R., Olson K.R., Christianson G., Manoguerra A.S., Chyka P.A., Caravati E.M., Wax P.M, Keyes D.C., Woolf A.D., Scharman E.J., Booze L.L., Troutman W.G., American Association of Poison Control Centers. Acetaminophen poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clin Toxicol (Phila).* 2006, 44 (1): 1-18.



Cite This Article: Arold Fazili, Armand ABASI, Nadege TSHIWIZA, Justin KABUAKA, et Edouard Tshibumbu. INFLUENCE DU PARACETAMOL A DOSE THERAPEUTIQUE SUR LES MARQUEURS HEPATIQUES (TRANSAMINASES ET GAMMA-GT) A LIKASI. *Am. J. innov. res. appl. sci.* 2023; 16(4): 167-171.

This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>