

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.06.007
文章编号: 1005-8982 (2022) 06-0038-06

实验研究·论著

尼莫地平对颅脑损伤模型大鼠早期血管生成的影响及其机制研究*

高继英¹, 石代乐², 王鹏飞², 李永³, 张玉², 乔建新², 张秀峰², 刘春江², 刘熙鹏²
(河北北方学院附属第一医院 1. 神经外科高压氧舱室, 2. 神经外科,
3. 医学影像中心, 河北 张家口 075000)

摘要: 目的 探究尼莫地平通过Akt/ERK通路对颅脑损伤模型大鼠早期血管生成的影响及其作用机制。
方法 25只SD雄性大鼠随机取8只作为对照组,其余大鼠复制颅脑损伤模型,1只模型复制失败,其余分为模型组和尼莫地平组,每组8只。尼莫地平组给予1 mg/(kg·d)尼莫地平,对照组和模型组均给予等量生理盐水。治疗7 d后,检测血管内皮细胞数及微血管密度(MVD),血清低氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、促血管生成素2(Ang-2)水平,比较脑组织病理学变化及Akt/ERK通路蛋白相对表达量。**结果** 模型组、尼莫地平组大鼠神经功能评分高于对照组($P < 0.05$);且模型组高于尼莫地平组($P < 0.05$)。模型组、尼莫地平组大鼠血管内皮细胞数和MVD多于对照组($P < 0.05$);且模型组均少于尼莫地平组($P < 0.05$)。模型组、尼莫地平组大鼠PI3K、pAkt/Akt、(pERK1/2)/(ERK1/2)蛋白相对表达量高于对照组($P < 0.05$);且模型组均低于尼莫地平组($P < 0.05$)。**结论** 尼莫地平能够促进颅脑损伤模型大鼠早期血管生成,其作用机制可能与Akt/ERK通路有关。

关键词: 颅脑损伤; 尼莫地平; 血管生成; Akt/ERK; 大鼠

中图分类号: R651.15

文献标识码: A

Effects of nimodipine on early angiogenesis in rat models of craniocerebral injury and its mechanism*

Ji-ying Gao¹, Dai-le Shi², Peng-fei Wang², Yong Li³, Yu Zhang², Jian-xin Qiao²,
Xiu-feng Zhang², Chun-jiang Liu², Xi-peng Liu²

(1. Hyperbaric Oxygen Chamber for Neurosurgery, 2. Department of Neurosurgery, 3. Medical Imaging Center, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of nimodipine on early angiogenesis in rat models with craniocerebral injury and its mechanism. **Methods** Eight of 25 male SD rats were randomly selected as the control group, and the rest rats were used to establish the craniocerebral injury models. Except the one that was unsuccessfully modeled, other rats were divided into model group and nimodipine group, with 8 rats in each group. The nimodipine group was given 1 mg/(kg·d) of nimodipine, while the control group and the model group were given the same amount of normal saline. After 7 days of treatment, the number of vascular endothelial cells, microvessel density (MVD), and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and angiopoietin-2 (Ang-2) levels were measured. The pathological changes of brain tissues and the protein expressions of Akt/ERK pathway-associated molecules were compared among the groups. **Results** The neurological scores of the model group and nimodipine group were higher relative to those of the control group ($P < 0.05$), and those of the model group were even higher than those of the nimodipine group ($P < 0.05$). The number of vascular endothelial cells and MVD in the model

收稿日期: 2021-11-26

* 基金项目: 河北省医学科研计划项目(No: 20170771)

group and nimodipine group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), and those in the model group were lower than those in the nimodipine group ($P < 0.05$). The protein levels of PI3K, pAkt/Akt, and (pERK1/2)/ (ERK1/2) in the model group and nimodipine group were higher compared with the control group ($P < 0.05$), while those of the model group were lower than those of the nimodipine group ($P < 0.05$). **Conclusions** Nimodipine promotes early angiogenesis in rat models of craniocerebral injury, and its mechanism may be related to the Akt/ERK pathway.

Keywords: craniocerebral injury; nimodipine; angiogenesis; Akt/ERK; rat

颅脑损伤是一种常见创伤,其神经功能恢复关系到患者预后及生活质量^[1]。血管新生是颅脑损伤后神经功能修复的重要部分,早期血管生成能改善局部供应血液,为脑组织提供营养物质,修复神经功能^[2-3]。尼莫地平是一种二氢吡啶钙通道拮抗剂,能有效透过血脑屏障。有研究显示,尼莫地平能够改善患者认知功能,推测其对脑部神经功能恢复具有一定作用^[4-6]。目前,临床上关于尼莫地平对颅脑损伤模型大鼠早期血管生成的研究较少,因此本研究通过复制颅脑损伤大鼠模型,探究尼莫地平对颅脑损伤模型大鼠早期血管生成的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级、8周龄、SD雄性大鼠25只,体重185~215 g,平均(200±15)g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,实验动物使用许可证号:SYXK(冀)2019-0040。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 尼莫地平(亚宝药业集团股份有限公司,国药准字H14022821,规格:20 mg),戊巴比妥钠(上海桥星贸易有限公司,CAS号:57-33-0),中性多聚甲醛(常州贝源鑫生物科技有限),大鼠CD34免疫组织化学试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司),大鼠低氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、促血管生成素2(Angiopoietin-2, Ang-2)酶联免疫试剂盒(上海一基实业有限公司),兔抗大鼠Akt、PI3K及ERK1/2单克隆抗体、山羊抗兔Akt、PI3K及ERK1/2二抗(上海酶研生物科技有限公司)。

1.2.2 主要仪器 -80℃低温冷藏箱(南京贝登医疗股份有限公司,型号:HD-86L830),离心机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,型号:M1324R),石蜡

切片机(北京佳源兴业科技有限公司,型号:HS-3315),电泳仪(上海土森视觉科技有限公司,型号:164-5056)。

1.3 方法

1.3.1 颅脑损伤模型大鼠的复制及分组 随机选取8只大鼠作为对照组,其余大鼠复制颅脑损伤模型^[7]。大鼠称重后,均腹腔注射2%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉。根据自由落体打击损伤法:剔除大鼠顶枕部毛,常规消毒后沿中线切开头皮,分离软组织,将颅骨暴露于视野中,在保证硬脑膜完整的前提下,于人字缝前约2 mm,中线旁约2 mm处,做一直径为4 mm的圆形骨窗,采用小锤(致伤力度为25 g)于25 cm高度下落,落于右侧硬脑膜,造成颅骨损伤,用骨蜡封闭颅骨损伤区域,并缝合头皮,观察大鼠生命体征、角膜反射、肢回缩、后肢屈曲反射,以翻正反应出现、自行爬动作为模型复制成功。

模型复制过程中1只大鼠死亡,其余大鼠随机分为模型组和尼莫地平组,每组8只。术后所有大鼠正常饲养,尼莫地平组给予1 mg/(kg·d)尼莫地平,连续灌胃7 d;对照组和观察组给予等量生理盐水。

1.3.2 标本采集及处理 治疗结束后,采集大鼠股动脉血5 ml,室温下放置1 h,2 000 r/min离心10 min,离心半径10 cm,提取上清液,置入-80℃冰箱冷冻保存。所有大鼠用10%水合氯醛溶液进行麻醉,迅速断头处死,打开颅腔取脑,避免损伤脑组织与硬脑膜,将各组4只大鼠右侧脑组织置于4%中性多聚甲醛固定,用于CD34免疫组织化学和苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。取出另外4只大鼠右侧脑组织后,迅速置于液氮中10 min,然后于-80℃冷藏箱中保存,用于检测蛋白相对表达量。

1.3.3 大鼠神经功能评分 根据Zea-longa评分^[8],将大鼠行为分为8个等级,评分为0~7分,大鼠

无不对称活动为 0 分；提尾后，大鼠右侧前肢不能伸展完全为 1 分；提尾后，前侧右肢不能伸展完全同时活动障碍为 2 分；大鼠右侧前肢贴胸为 3 分；大鼠活动时明显向右转弯为 4 分；向右转弯同时右侧前爪向后拖地为 5 分；原地右转弯为 6 分；无法站立，只能右侧躺为 7 分。

1.3.4 大鼠血管内皮细胞数及微血管密度 (microvessel density, MVD) 检测 取固定后的脑组织，脱水后石蜡包埋，将损伤部位及其周围组织切片（厚 4 μm ），按照 CD34 免疫组织化学试剂盒说明书进行染色，血管内皮细胞为浅棕或棕黄色的颗粒为 CD34 阳性，单个内皮细胞为 1 个血管单位，随机选取 5 个高倍视野，观察并计算每个视野内皮细胞数和 MVD^[9]。

1.3.5 大鼠血清 HIF-1 α 、Ang-2 水平检测 取上层血清，采用酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清 HIF-1 α 、Ang-2 水平，并严格按照 HIF-1 α 、Ang-2 ELISA 试剂盒说明书进行操作^[10]。

1.3.6 大鼠脑组织病理检查 取固定后的脑组织，脱水后石蜡包埋，切片约 4 μm 厚，HE 染色后置于光镜下，观察大鼠脑组织病理学变化^[11]。

1.3.7 Western blotting 检测 Akt/ERK 通路蛋白的表达 取液氮保存的脑组织，研磨成匀浆后，加入裂解液，离心后取上清液进行蛋白浓度测定。加入上样缓冲液后进行电泳，分离蛋白质，转膜后采用脱脂奶粉室温封闭 1 h，分别加入兔抗鼠一抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，冲洗后，再加入羊抗兔二抗，室温孵育 1h，经 ECL 显影得到结果^[12]。目的蛋白与 β -actin 蛋白灰度值的比值为蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，比较用方差分析，进一步两两比较用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.2 大鼠神经功能评分比较

对照组、模型组、尼莫地平组大鼠神经功能评分分别为 (0.00 \pm 0.00) 分、(4.42 \pm 0.61) 分和 (2.57 \pm 0.78) 分，经方差分析，差异有统计学意义 ($F =$

120.607, $P = 0.000$)。进一步两两比较结果：模型组、尼莫地平组高于对照组 ($P < 0.05$)；且模型组高于尼莫地平组 ($P < 0.05$)。

2.2 大鼠血管内皮细胞数和 MVD 比较

对照组、模型组、尼莫地平组大鼠血管内皮细胞数和 MVD 比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果：模型组、尼莫地平组均多于对照组 ($P < 0.05$)；且模型组均少于尼莫地平组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 组大鼠血管内皮细胞数及 MVD 比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	血管内皮细胞数/(个/HP)	MVD/(条/ mm^2)
对照组	68.19 \pm 6.28	6.08 \pm 0.95
模型组	113.92 \pm 5.58 ^①	8.82 \pm 0.68 ^①
尼莫地平组	156.25 \pm 6.83 ^{①②}	12.11 \pm 1.87 ^{①②}
F 值	397.108	44.998
P 值	0.000	0.000

注：①与对照组比较， $P < 0.05$ ；②与模型组比较， $P < 0.05$ 。

2.3 大鼠血清 HIF-1 α 、Ang-2 水平比较

对照组、模型组、尼莫地平组大鼠 HIF-1 α 、Ang-2 水平比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果：模型组、尼莫地平组均高于对照组 ($P < 0.05$)；且模型组均低于尼莫地平组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组大鼠血清 HIF-1 α 、Ang-2 水平比较

($n = 8, \text{ng/mL}, \bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α	Ang-2
对照组	14.19 \pm 4.28	11.83 \pm 6.14
模型组	45.92 \pm 5.58 ^①	39.82 \pm 9.35 ^①
尼莫地平组	84.86 \pm 7.31 ^{①②}	79.85 \pm 12.26 ^{①②}
F 值	292.246	101.842
P 值	0.000	0.000

注：①与对照组比较， $P < 0.05$ ；②与模型组比较， $P < 0.05$ 。

2.4 大鼠脑组织的病理检查结果

对照组脑组织结构完整，神经元细胞及神经纤维整齐排列。模型组损伤部位出现细胞和血管坏死，神经元细胞周围肿胀，细胞间隙增大，部分神经元细胞凋亡，毛细血管肿胀，管壁结构部分破损。尼莫地平组脑组织部分神经细胞死亡，水肿减轻，神经细胞排列略微紊乱，部分细胞仍见细胞质凝

集,局部可见血管着色密集。见图1。

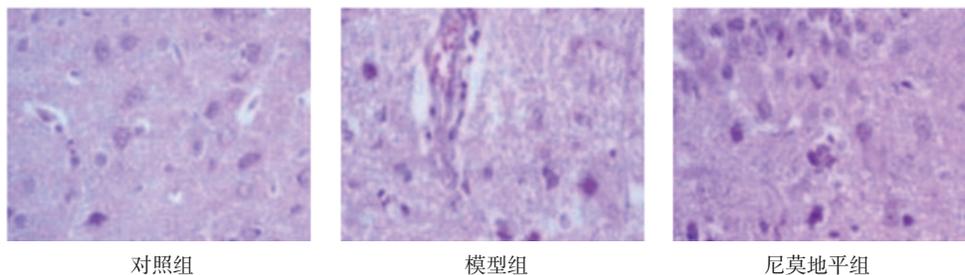


图1 3组大鼠脑组织病理切片 (HE×400)

2.5 大鼠Akt/ERK通路蛋白相对表达量比较

对照组、模型组、尼莫地平组大鼠PI3K、pAkt/Akt、(pERK1/2)/(ERK1/2)蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较结果:模型组、尼莫地平组均高于对照组($P < 0.05$);且模型组均低于尼莫地平组($P < 0.05$)。见表3和图2。

表3 3组大鼠Akt/ERK通路蛋白相对表达情况比较
($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	PI3K	pAkt/Akt	(pERK1/2)/(ERK1/2)
对照组	0.22 ± 0.03	0.24 ± 0.04	0.41 ± 0.02
模型组	0.55 ± 0.06 ^①	0.48 ± 0.06 ^①	0.59 ± 0.04 ^①
尼莫地平组	0.89 ± 0.04 ^{①②}	0.72 ± 0.06 ^{①②}	0.81 ± 0.03 ^{①②}
F值	441.574	157.091	377.655
P值	0.000	0.000	0.000

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

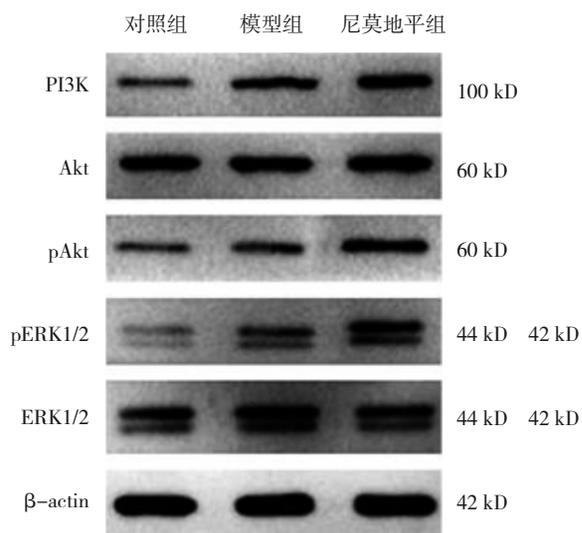


图2 大鼠脑组织Akt/ERK通路蛋白的表达

3 讨论

血管新生是颅脑损伤后神经功能修复的重要机制,能够为受损区域的组织及细胞提供营养物质,改善血液循环,加速脑组织及神经功能的修复^[13-14]。有研究显示,血管生成与脑部损伤的预后有关,因此血管生成成为脑部疾病研究的新热点^[15]。治疗性血管生成是指通过药物促进血管生成^[16]。尼莫地平一般用于改善急性脑血管病的血液循环,在早期血管生成方面研究较少,本研究通过复制颅脑损伤模型大鼠,探究尼莫地平通过Akt/ERK通路对早期血管生成的影响,为颅脑损伤后的疾病恢复提供证据支持。

本研究对各组大鼠神经功能进行评估,通过神经修复体现血管新生情况,结果显示模型组大鼠神经功能损伤,而尼莫地平对神经损伤具有一定的修复作用。内皮细胞数和MVD能够反映血管新生的强度,本研究中,模型组内皮细胞数和MVD多于对照组,表明在颅脑损伤后,机体会形成部分新生血管,而尼莫地平组内皮细胞数和MVD均多于对照组和模型组,提示在尼莫地平的作用下,血管的新生作用更强。

HIF-1 α 为低氧诱导因子,在缺氧条件下能够调节多种基因,具有改善能量代谢、减少脑组织及神经细胞受损的作用,同时HIF-1 α 能促进血管生成。有研究证实,HIF-1 α 对改善脑缺血再灌注的严重程度和预后具有重要意义^[17]。Ang家族因子促进血管新生的作用更强,Ang-2是Ang家族因子中的一种分泌型因子^[18]。相关研究表明,正常情况下Ang-2仅表达于血管重建部位,其在组织损伤修复过程中具有重要意义,Ang-2在VEGF的作用下能够诱导内皮细胞增殖、转移,促进新生血管的形成^[19]。本研究中

尼莫地平组 Ang-2 明显高于对照组和模型组,提示尼莫地平对颅脑损伤模型大鼠早期血管生成有促进作用。

本研究对大鼠脑组织进行病理检查,结果显示对照组脑组织结构完整,神经元细胞及神经纤维整齐排列;模型组损伤部位出现细胞和血管坏死,神经元细胞周围肿胀,细胞间隙增大,部分神经元细胞凋亡,毛细血管肿胀,管壁结构部分破损。经尼莫地平给药后,脑组织部分神经细胞死亡,水肿减轻,神经细胞排列略微紊乱,部分细胞仍见胞质凝集,局部可见血管着色密集,表明在尼莫地平的作用下,脑组织神经受损情况明显改善,并有新生血管形成。

Akt/ERK 通路包括 PI3K/Akt 信号通路和 ERK1/2 信号通路。PI3K/Akt 通路中, Akt 通常为失活状态,磷酸化后活化,形成 pAkt,能够激活 PI3K/Akt 通路,其中 Akt 参与细胞增殖、凋亡,而 PI3K 是细胞中重要的信号蛋白,能够调控 Akt 的活化^[20]。ERK1/2 能够传导丝裂酶原信号,激活后形成 pERK1/2,能调控细胞核内的转录因子,刺激多种转录因子磷酸化,增强转录活性,加速细胞的增殖、转移,有利于血管的新生^[21]。本研究中,模型组 pAkt/Akt、PI3K 及 (pERK1/2)/(ERK1/2) 蛋白表达上调,表明大鼠颅脑损伤后,部分通路被激活,而尼莫地平组 Akt/ERK 相关蛋白表达均上调,提示 Akt/ERK 通路在莫地平的作用下被激活。

综上所述,尼莫地平能够促进颅脑损伤模型大鼠早期血管生成,其作用机制可能与 Akt/ERK 通路有关。本研究仅表明 Akt/ERK 通路可能与颅脑损伤模型大鼠早期血管生成有关,为进一步验证 Akt/ERK 通路在颅脑损伤模型大鼠早期血管形成中的作用,后续可将该通路上下游蛋白敲除,进行深入研究,为颅脑损伤的治疗提供更充分的证据支持。

参 考 文 献 :

- [1] 顾宇丹,费雅雅,秦殊,等. 刺激性干预在老年创伤性颅脑损伤昏迷患者中的应用[J]. 中华护理杂志, 2020, 55(2): 228-231.
- [2] 吕雯奇,李仕鹏,周贤喆,等. 神经血管单元功能障碍在创伤性颅脑损伤后神经变性中的作用机制[J]. 中华神经医学杂志, 2020, 19(8): 844-848.
- [3] LI Q, CHENG K, WANG A Y, et al. MicroRNA-126 inhibits tube formation of HUVECs by interacting with EGFL7 and down-regulating PI3K/AKT signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 3(116): 109007.
- [4] CARLSON A P, HANGGI D, MACDONALD R L, et al. Nimodipine reappraised: an old drug with a future[J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(1): 65-82.
- [5] KAMASAK K, BASARSLAN K, DAGLI A T, et al. Effects of nimodipine and nigella sativa on oxidative stress and apoptosis in serum and brain tissue of rats with experimental head trauma[J]. Turk Neurosurg, 2021, 31(1): 8-17.
- [6] 王增英,董晓柳,崔璐莎,等. 奥拉西坦联合尼莫地平治疗中风致轻度认知功能障碍的效果及对NSE、S100 β 和A β 水平的影响[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(3): 68-71.
- [7] BODNAR C N, ROBERTS K N, HIGGINS E K, et al. A systematic review of closed head injury models of mild traumatic brain injury in mice and rats[J]. J Neurotrauma, 2019, 36(11): 1683-1706.
- [8] 卢小叶,吕倩忆,李棋龙,等. Zea-longa 评分与改良 Garcia 评分应用于针刺治疗 CIRI 大鼠神经功能缺损评估的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(9): 1356-1360.
- [9] LI Y Y, WANG Z W, MAO M, et al. Velvet antler mobilizes endothelial progenitor cells to promote angiogenesis and repair vascular endothelial injury in rats following myocardial infarction[J]. Front Physiol, 2019, 17(9): 1940-1952.
- [10] 张芳,张波,钱发才. 益血方对急性脑梗死大鼠血管新生的作用及对促血管生成因子 HIF-1 α 和 Ang-2 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2019, 28(6): 1007-1010.
- [11] 周海燕,周俐红,张彩霞,等. 吴茱萸次碱对局灶性脑缺血模型大鼠脑组织病理、免疫失衡和氧化应激的调节作用及机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(6): 677-681.
- [12] HUANG S M, TAN Z G, CAI J R, et al. Myrtenol improves brain damage and promotes angiogenesis in rats with cerebral infarction by activating the ERK1/2 signalling pathway[J]. Pharm Biol, 2021, 59(1): 584-593.
- [13] CHENG C, WANG X, JIANG Y, et al. Recombinant annexin A2 administration improves neurological outcomes after traumatic brain injury in mice[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 708469.
- [14] 杨仁义,周德生,傅馨莹,等. 基于 STAT3/miRNA 反馈环路探讨中医药促脑梗死后血管新生的调控机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 221-228.
- [15] 郑迪,周骏宇,王亮. 丁苯酞对实验性脑梗死大鼠神经功能改善,脑保护及促进血管新生的作用[J]. 中国药师, 2019, 22(11): 2003-2007.
- [16] 孙立平,周霞,刘炬,等. 从调控血管内皮生长因子及其受体激活 Notch 信号通路角度探讨地稗醇促血管新生及神经功能重塑作用[J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29(11): 63-68.
- [17] YU F, TONG L J, CAI D S. Sevoflurane inhibits neuronal apoptosis and expressions of HIF-1 and HSP70 in brain tissues of rats with cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(9): 5082-5090.

- [18] DI TACCHIO M, MACAS J, WEISSENBERGER J, et al. Tumor vessel normalization, immunostimulatory reprogramming, and improved survival in glioblastoma with combined inhibition of PD-1, Angiopoietin-2, and VEGF[J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(12): 1910-1927.
- [19] KOVALCHUK B, BERGHOF A S, KARREMAN M A, et al. Nintedanib and a bi-specific anti-VEGF/Ang2 nanobody selectively prevent brain metastases of lung adenocarcinoma cells[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2020, 37(6): 637-648.
- [20] SAMAKOVA A, GAZOVA A, SABOVA N, et al. The PI3k/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiologic condition in ischemia[J]. *Physiol Res*, 2019, 68(2): 131-138.
- [21] ZHANG Q, LU S H, LI T F, et al. ACE2 inhibits breast cancer angiogenesis via suppressing the VEGFa/VEGFR2/ERK pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 173.
(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 高继英, 石代乐, 王鹏飞, 等. 尼莫地平对颅脑损伤模型大鼠早期血管生成的影响及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(6): 38-43.

Cite this article as: GAO J Y, SHI D L, WANG P F, et al. Effects of nimodipine on early angiogenesis in rat models of craniocerebral injury and its mechanism[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(6): 38-43.