

加味身痛逐瘀汤对骨质疏松模型大鼠疗效及作用机制探讨

韩鹏勃¹ 蒋 锋² 姚亚波¹ 韩 刚¹

(1 西安医学院第二附属医院,西安,710038; 2 陕西省友谊医院,西安,710068)

摘要 目的:探讨加味身痛逐瘀汤对骨质疏松模型大鼠疗效,同时观察其对生物力学及骨代谢水平的影响。方法:将80只雌性wistar大鼠纳入研究,随机分为空白组($n=10$)及造模组($n=70$),所有造模组大鼠接受切除子宫模拟骨质疏松模型。将60只造模成功大鼠随机分为安慰组、对照组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组,每组15只。其中中药组大鼠接受加味身痛逐瘀汤灌胃,高剂量组(1.32 g/mL)、中剂量组(0.66 g/mL)、低剂量组(0.33 g/mL),灌胃1次/d,连续灌胃3周;安慰组大鼠接受生理盐水灌胃,10 mL/次,1次/d,连续灌胃3周;对照组大鼠给予降钙素注射液注射,2次/周,连续注射3周。3周后检测各组右侧股骨大鼠骨生物力学相关数据、右侧胫骨骨矿物密度和骨小梁结构变化、血清骨钙素、血清I型胶原氨基端肽原(PINP)浓度变化。结果:1)与空白组比较,造模组大鼠弹性模量、最大载荷降低($P < 0.05$),与安慰组比较,对照组及中药组弹性模量、最大载荷显著升高($P < 0.01$)。随着剂量的增加,中药组大鼠弹性模量、最大载荷显著增高($P < 0.05$)。2)与空白组比较,造模组BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th降低($P < 0.05$);与安慰组比较,对照组及中药组骨密度显著升高($P < 0.01$);加味身痛逐瘀汤中剂量组和高剂量组大鼠骨密度较低剂量组增高($P < 0.05$)。3)与空白组比较,造模组血清BGP和PINP均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与造模组比较,中药组血清BGP和PINP均明显降低,随着加味身痛逐瘀汤浓度增加BGP和PINP下降的趋势更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:加味身痛逐瘀汤可能通过降低骨质疏松模型大鼠血清BGP和PINP含量,提高骨生物力学性能,纠正骨退行性改变,实现治疗骨质疏松的目的。

关键词 骨质疏松;加味身痛逐瘀汤;骨密度;生物力学;骨代谢;骨结构;BGP;PINP

Clinical Effects and Mechanism of Jiawei Shentong Zhuyu Decoction on Osteoporosis Model Rats

Han Pengbo¹, Jiang Feng², Yao Yabo¹, Han Gang¹

(1 Department of Critical Care Medicine, Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710038, China;

2 Department of Orthopaedics, Shaanxi Friendship Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Jiawei Shentong Zhuyu Decoction on osteoporosis model rats, and to observe its effects on biomechanics and bone metabolism. **Methods:** A total of 80 female Wistar rats were randomly divided into a blank group (10 rats) and a model group (70 rats). All rats in model group received hysterectomy to simulate osteoporosis. 60 successfully modeling rats were randomly divided into a placebo group, a control group, a low-dose group, a medium-dose group and a high-dose group, with 15 rats in each group. The rats in the traditional Chinese medicine group were given modified Shentong Zhuyu Decoction by gavage, with the high-dose group (1.32 g/mL), the medium-dose group (0.66 g/mL) and the low-dose group (0.33 g/mL), once a day for 3 weeks; the rats in the placebo group were given saline by gavage, 10 mL/time, once a day for 3 weeks; the rats in the control group were given calcitonin injection, twice a week, for 3 weeks. After 3 weeks, bone biomechanical data, mineral density and trabecular structure of right tibia, serum osteocalcin and serum type I collagen telopeptide (PINP) were measured. **Results:** Compared with the blank group, the modulus of elasticity and the maximum load of the model group were decreased ($P < 0.05$). Compared with the placebo group, the modulus of elasticity and the maximum load of the control group and the traditional Chinese medicine group increased significantly ($P < 0.01$). With the increase of dose, the elastic modulus and maximum load of the rats in the traditional Chinese medicine group increased significantly ($P < 0.05$). 2) Compared with the blank group, BMD, BV/TV, Tb. N and Tb. Th in the model group decreased ($P < 0.05$); BMD in the control group and the traditional Chinese medicine group increased significantly ($P < 0.01$); BMD in the middle-dose group and the high-dose group increased significantly ($P < 0.05$). 3) Compared with the blank group, the serum BGP and PINP levels in the model group were significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, the serum BGP and PINP in the traditional Chinese medicine group were significantly decreased. With the concentration of modified Shentong Zhuyu Decoction increasing, the trend of BGP and PINP declining was more obvious, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Jiawei Shentong Zhuyu Decoction can improve the biomechanical properties of bone and correct the degenerative changes of bone by reducing the

基金项目:2017 陕西自然科学基金基础研究计划项目(2017JM8146)

作者简介:韩鹏勃(1979.03—),男,研究生,副主任医师,研究方向:骨质疏松及颈肩腰腿痛,E-mail:asdvsrd@163.com

通信作者:蒋锋(1983.11—),男,研究生,副主任医师,研究方向:骨性关节炎的临床与基础研究,E-mail:ccjfeng@163.com

content of BGP and PINP in serum of osteoporosis model rats, so as to achieve the goal of treating osteoporosis.

Key Words Osteoporosis; Modified Shentong Zhuyu Decoction; Bone mineral density; Biomechanics; Bone metabolism; Bone structure; BGP; PINP

中国分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.11.018

骨质疏松是临床常见全身性骨骼疾病,以骨量减少、骨强度减低为主要病理变化,导致骨质脆性增加易骨折,严重影响患者的日常生命质量^[1-2]。微创手术虽可在一定程度缓解患者的临床症状,但无法延缓病情的发展。骨质疏松属于中医学“痹证”“痛症”等范畴,“肝肾不足、瘀血阻滞”是其主要病机,基于治病求本的原则我们认为“补益肝肾、活血化瘀止痛”是重要治则^[3-4]。身痛逐瘀汤源自《医林改错注释》,用于治疗肩痛、臂痛、腰腿痛,或周身疼痛,经久不愈者。本团队将身痛逐瘀汤大量运用于骨质疏松的治疗,获得了理想疗效,这与国内外诸多文献所报道一致^[5-7],但其作用机制目前尚未清楚。故我们利用骨质疏松模型鼠,对其进行身痛逐瘀汤干预,探讨其可能的作用机制,具体如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选购80只6个月龄清洁级雌性wistar大鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXX(沪)20070005,体质量(294±16)g。所有动物饲养于西安交通大学动物实验中心,饲养条件:温度(22±1.5)℃,湿度(50±1.5)%,12h/12h光暗周期。

1.1.2 药物 加味身痛逐瘀汤由本院中药研究院提供,中药组成:秦艽12g、羌活12g、桃仁9g、红花9g、当归9g、川芎9g、没药9g、五灵脂9g、香附6g、牛膝12g、地龙9g、甘草6g、续断9g、狗脊9g。按大鼠与人体间等效剂量换算将通窍止鼻汤分为高剂量(1.32g/mL)、中剂量组(0.66g/mL)、低剂量组(0.33g/mL)。

1.1.3 试剂与仪器 10%水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司,国药准字H37022673);台式离心机(上海安亭科学仪器厂,型号:JI80-2B);电子万能材料试验机(日本岛津公司,型号:AUTO-GRAPH);血清骨素钙试剂盒[武汉明德生物有限公司,货号:鄂食药监械(准)字2014第2401995号]、PINP(武汉菲恩生物科技有限公司,货号:ER7261)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 适应喂食2周后,禁食不禁水12h,以10%水合氯醛,按0.35mL/100g体质量

量腹腔注射麻醉,取俯卧位,以肋下1cm,脊柱2cm处为中心剪除长毛,常规消毒,背部切口,切口约1~2cm,逐层分离脂肪、肌肉,用眼科剪探向腹腔深处靠大鼠身体外侧,小心提出腹腔脂肪,轻轻翻查可见由脂肪组织包绕的梅花状卵巢及紧密相连的输卵管,用止血钳夹住输卵管结扎,剪去卵巢,止血后将拉出的脂肪组织送回腹腔内,将肌膜与肌层一起缝合,撒以青霉素粉,缝合皮肤,采取侧卧式放回笼中,正常饮水。模型验证:测量骨密度,再次进行疼痛行为检测,并分别记录热痛觉行为,自发痛觉行为,机械痛觉行为检测,证明骨质疏松疼痛模型建立。80只大鼠随机分为空白组(10只)及造模组(70只),所有造模组大鼠接受切除子宫模拟骨质疏松模型,将60只造模成功大鼠(成功率85.71%)随机分为安慰组、对照组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组,每组15只。

1.2.2 干预方法 中药组大鼠接受加味身痛逐瘀汤灌胃,高剂量组(1.32g/mL)、中剂量组(0.66g/mL)、低剂量组(0.33g/mL),灌胃1次/d,连续灌胃3周;安慰组大鼠接受生理盐水灌胃,10mL/次,1次/d,连续灌胃3周;对照组大鼠给予降钙素注射液注射,2次/周,连续注射3周。

1.3 观察指标

1.3.1 大鼠骨生物力学变化 干预后各组随机选取3只大鼠,利用电子万能材料试验机对各组大鼠右侧股骨进行三点弯曲试验以检测其生物力学性能,具体条件如下:两端跨距20mm,下压速度5mm/min,直至标本断裂。同时取大鼠L5椎体进行压缩试验,计算出最大应力、抗压强度和弹性模量。

1.3.2 右侧胫骨骨矿物密度和骨小梁结构 干预后各组随机选取3只大鼠,使用显微CT(Micro CT)对各组大鼠左侧胫骨近干骺端进行扫描,对胫骨近干骺端约1.5mm×1.5mm×1.5mm处进行三维重建,利用相应软件对图像进行处理后得出BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp数据。

1.3.3 血清骨钙素、血清I型胶原氨基端肽原浓度变化 干预后各组随机选取3只大鼠,取其腹主动脉血,充分离心后分离出上清液,采用ELISA检测法进行BGP和PINP浓度测定,用碳酸盐包被缓冲液

表 1 各组不同部位生物力学指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	右侧股骨		L5	
	弹性模量(Gpa)	最大载荷(N)	弹性模量(Gpa)	最大载荷(N)
空白组	7.23 ± 1.87	174.57 ± 21.98	343.27 ± 99.18	359.38 ± 15.29
安慰组	4.31 ± 1.21*	102.28 ± 11.28*	201.28 ± 65.48*	212.28 ± 7.28*
对照组	5.25 ± 1.32* [△]	114.35 ± 12.22* [△]	249.28 ± 68.48* [△]	255.62 ± 8.99* [△]
低剂量组	5.79 ± 1.44* ^{△▲}	128.28 ± 15.29* ^{△▲}	269.28 ± 70.28* ^{△▲}	288.28 ± 9.23* ^{△▲}
中剂量组	6.01 ± 1.52* ^{△▲□}	138.28 ± 17.28* ^{△▲□}	282.28 ± 73.28* ^{△▲□}	301.28 ± 10.25* ^{△▲□}
高剂量组	6.48 ± 1.76* ^{△▲□■}	142.28 ± 20.19* ^{△▲□}	311.28 ± 80.11* ^{△▲□}	328.38 ± 11.29* ^{△▲□}

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与安慰组比较,[△] $P < 0.05$;与对照组比较比较,[▲] $P < 0.05$;与低剂量组比较,[□] $P < 0.05$;与中剂量组比较,[■] $P < 0.05$

表 2 各组骨矿物密度和骨小梁结构相关指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	BMD(mg/cm ²)	BV/TV(%)	Tb. N(个/mm)	Tb. Th(mm)
空白组	584.23 ± 78.57	0.58 ± 0.07	3.83 ± 0.61	0.39 ± 0.02
安慰组	264.23 ± 40.31*	0.31 ± 0.02*	2.51 ± 0.17*	0.28 ± 0.011*
对照组	305.77 ± 51.32* [△]	0.36 ± 0.02* [△]	2.78 ± 0.22* [△]	0.29 ± 0.013* [△]
低剂量组	336.28 ± 58.48* ^{△▲}	0.41 ± 0.03* ^{△▲}	2.99 ± 0.31* ^{△▲}	0.31 ± 0.014* ^{△▲}
中剂量组	409.12 ± 61.52* ^{△▲□}	0.47 ± 0.03* ^{△▲□}	3.16 ± 0.43* ^{△▲□}	0.32 ± 0.018* ^{△▲□}
高剂量组	482.43 ± 71.36* ^{△▲□■}	0.51 ± 0.05* ^{△▲□}	3.37 ± 0.51* ^{△▲□}	0.34 ± 0.02* ^{△▲□}

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与安慰组比较,[△] $P < 0.05$;与对照组比较比较,[▲] $P < 0.05$;与低剂量组比较,[□] $P < 0.05$;与中剂量组比较,[■] $P < 0.05$

将抗体稀释至适量浓度后加至反应孔中加 0.1 mL, 4℃ 孵育过夜, 后用 PBS 冲洗 3 次, 2 min/次, 随后加入待测样品, 室温下反应 1 h, 随后用 PBS 冲洗 3 次, 2 min/次, 加入新鲜稀释的酶标抗体, 室温下孵育 1 h 后洗涤。然后再于每个反应孔中加入 TMB 底物溶液 0.1 mL, 充分反应后加入 2 mol/L 的硫酸溶液 0.05 mL 显色, 在酶标仪中进行显色测定, 计算出 OD 值, 操作过程严格按照说明书进行。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。所得数据都用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来描述, 组间秩和检验; 组内比较采用配对 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠生物力学比较 与空白组比较, 造模组大鼠弹性模量、最大载荷降低($P < 0.05$), 与安慰组比较, 对照组及中药组弹性模量、最大载荷显著升高($P < 0.01$)。随着剂量的增加, 中药组大鼠弹性模量、最大载荷显著增高($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组骨矿物密度和骨小梁结构比较 与空白组比较, 造模组 BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 降低($P < 0.05$); 与安慰组比较, 对照组及中药组 BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 显著升高($P < 0.01$); 加味身痛逐瘀汤中剂量组和高剂量组大鼠上述指标较低剂量组增高($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 各组大鼠 BGP 和 PINP 浓度变化 与空白组比较, 造模组血清 BGP 和 PINP 均明显升高, 差异有

统计学意义($P < 0.05$)。与造模组比较, 中药组血清 BGP 和 PINP 均明显降低, 随着加味身痛逐瘀汤浓度增加 BGP 和 PINP 下降的趋势更明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组 BGP 和 PINP 浓度比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	BGP(μg/L)	PINP(μg/L)
空白组	20.98 ± 3.63	28.38 ± 1.28
安慰组	79.28 ± 8.28*	102.29 ± 9.28*
对照组	68.28 ± 7.11* [△]	89.28 ± 7.02* [△]
低剂量组	53.28 ± 6.52* ^{△▲}	71.02 ± 5.89* ^{△▲}
中剂量组	40.23 ± 5.01* ^{△▲□}	63.28 ± 4.19* ^{△▲□}
高剂量组	31.28 ± 4.12* ^{△▲□■}	44.27 ± 2.89* ^{△▲□}

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与安慰组比较,[△] $P < 0.05$;与对照组比较比较,[▲] $P < 0.05$;与低剂量组比较,[□] $P < 0.05$;与中剂量组比较,[■] $P < 0.05$

3 讨论

中医古籍并无骨质疏松这一病名记载, 其属于“痛症”“骨痿”“骨枯”等范畴, 认为与肾及骨关系极为密切。肾乃先天之本, 藏精主骨生髓。肾精充沛生化有源, 则骨骼强壮, 年老者肾精亏虚, 致骨髓生化乏源, 骨骼痿软无力^[8]。此外, 元气亏虚致血液运行无力, 因虚致瘀, 脉络瘀滞不畅, 脉道内气血不足必引发瘀血形成, 阻滞水谷精微等物质布散, 骨髓也因此不得充润而出现骨痛、骨折等临床症状, 即骨质疏松症^[9-11]。正如《医林改错》中曰:“元气既虚, 必不能达于血管, 血管无气, 必停留而瘀”;《灵枢》中也认为:“老者之气血衰, 其肌肉枯, 气道涩”。

认为肾虚及血瘀是骨质疏松发生发展重要原因,基于此,王清任提出从“气血”着手治疗骨质疏松症,正如其提出“诸痹症疼痛”,从而提出了身痛逐瘀汤这一经典名方。方中桃仁、红花、当归、川芎有活血化瘀之功,秦艽、羌活可祛风湿除痹通,五灵脂和香附是行气止痛的要药,牛膝及地龙则可通利关节,此外,当归亦是活血补血之药,而牛膝及甘草还有补益之性;基于“肝肾同源”,本方加续断及狗脊以补肝肾,续筋骨,调血脉,整方共奏补益肝肾、活血化瘀之功^[11-12]。

本研究为进一步探析加味身痛逐瘀汤的作用机制,测试了各组大鼠右股骨及 L5 的生物力学指标,生物力学是体现骨组织对外界作用下的生物学效应,是评价骨组织抗骨折能力的重要方法^[13-14]。本研究结果显示空白组大鼠右股骨及 L5 的弹性模量、最大载荷均明显高于造模组大鼠,这说明骨质疏松大鼠的生物力学效应的确产生了明显的改变,而通过一定干预措施后大鼠抗骨折能力明显提高,其中加味身痛逐瘀汤较降钙素更可改善骨质疏松大鼠的生物力学能力,并随着剂量的增加,中药组大鼠弹性模量、最大载荷显著增高($P < 0.05$)。在本研究中我们利用 Micro CT 对各组大鼠左胫骨的骨矿物密度和骨小梁结构进行观察,结果显示造模后大鼠 BMD、BV/TV、Tb. N、Tb. Th 降低,其中加味身痛逐瘀汤较降钙素更可改善骨质疏松大鼠矿物密度和骨小梁结构,并随着剂量的增加上述指标改善更为明显。这说明加味身痛逐瘀汤使骨组织衰退结构得到改善,降低骨脆性,降低骨折风险。

在对作用机制的研究中我们检测了各组大鼠骨钙素及 PINP 浓度的变化,结果显示造模后骨钙素及 PINP 浓度明显升高。BGP 由成骨细胞合成及分泌,是骨组织维持正常矿化速度的关键,是反映成骨细胞活性程度及骨代谢水平的重要因子。有研究^[15-16]认为随着机体雌激素的减少,其抑制破骨细胞活性的能力被削弱,随之导致骨吸收增加,进而形成高转换率型骨质疏松,其中 BGP 表达明显上调是高转换率型骨质疏松的生化指征。此外,随着骨转换率增加机体 PINP 表达亦明显上调,集体大部分骨基质由 I 型胶原形成, I 型原骨胶原有羧基和氨基延长端,一个胶原分子的合成可产生一个分子的 PINP,是体现骨骼代谢的重要标志物^[17,18]。故下调 BGP 及 PINP 浓度是改善骨质疏松的重要途径。本研究显示与对照组比较,中药组血清 BGP 和 PINP 均明显降低,随着加味身痛逐瘀汤浓度增加

BGP 及 PINP 下降的趋势更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$),故加味身痛逐瘀汤可以通过抑制 BGP 及 PINP 的表达而发挥抑制骨的高转化状态的作用,从而改善骨质疏松症。

综上所述,加味身痛逐瘀汤可能通过降低骨质疏松模型大鼠血清 BGP 和 PINP 含量,提高骨生物力学性能,纠正骨退行性改变,实现治疗骨质疏松的目的。

参考文献

- [1] 马辉平. 唑来膦酸注射液联合碳酸钙 D3 片对绝经后骨质疏松的临床疗效观察[J]. 河北医学, 2018, 24(12): 2065-2070.
- [2] 夏烨, 王怡茹, 莫文, 等. 调身通痹汤联合药渣烫熨治疗老年原发性骨质疏松症临床疗效观察[J]. 河北医学, 2018, 24(12): 2105-2108.
- [3] 翁绳健, 吴立忠, 李炜明, 等. 肾虚与骨质疏松症关联性研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(12): 85-88.
- [4] 张荣华, 陈可冀, 陆大祥, 等. 益骨胶囊治疗绝经后骨质疏松症的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8): 680-684.
- [5] 李冰. 身痛逐瘀汤加减治疗单纯骨质疏松型椎体压缩性骨折的临床观察[J]. 云南中医中药杂志, 2018, 39(9): 54-55.
- [6] 凌楠. 温针对绝经后骨质疏松症骨密度的影响及疗效研究[J]. 中国针灸, 2004, 24(11): 744-746.
- [7] 王阳. 身痛逐瘀汤联合 PVP 治疗骨质疏松性椎体压缩骨折的临床研究[D]. 太原: 山西中医学院, 2015.
- [8] 张卫涛, 黄炜, 殷杰, 等. 补肾壮骨汤联合阿托伐他汀治疗糖尿病性骨质疏松症临床研究[J]. 中医学报, 2016, 31(12): 1880-1884.
- [9] 赖福崇, 马磊, 欧飞微, 等. 浅谈围绝经期骨质疏松的中医辨治[J]. 光明中医, 2018, 33(21): 3131-3134.
- [10] 王运来. 中医药防治骨质疏松症临床观察[J]. 北方药学, 2018, 15(11): 155-156.
- [11] 王伟, 冯小波, 宋红, 等. 骨质疏松症的中医病因病机及其治疗进展[J]. 中国社区医师, 2018, 34(30): 19-20.
- [12] 王阳, 宋洁富. 中西医结合治疗骨质疏松性椎体压缩骨折临床观察[J]. 中医临床研究, 2015, 7(10): 22-24.
- [13] 李家琼, 王冬梅, 孙璟川, 等. n-HA/PA66 椎体增强器和椎体成形术治疗骨质疏松性椎体骨折的生物力学效果比较[J]. 医用生物力学, 2018, 33(6): 529-536.
- [14] 邓亮, 熊亮宇, 曾纪焯. 雷奈酸锶对磷酸钙骨水泥强化大鼠椎体骨质量和生物力学性能的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2018, 26(22): 2094-2098.
- [15] 张震, 张庆峰, 李伟, 等. 阿仑膦酸钠应用于老年髋部骨质疏松性骨折患者对 BGP、PTH、BALP 表达及预防复发的效果[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(24): 5981-5983.
- [16] 李建军, 庄学伟, 乔晓鸣. 阿法骨化醇联合钙剂对老年性骨质疏松患者骨钙素、I 型胶原 C 端异构肽水平及骨密度的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(23): 5760-5762.
- [17] 刘安伟. 基于“骨枯髓空”理论从肾论治绝经后骨质疏松症[J]. 中国药物经济学, 2018, 13(10): 56-59.
- [18] 李阳. 2 型糖尿病合并骨质疏松患者生化指标及骨代谢指标分析[J]. 中国卫生工程学, 2018, 17(5): 759-761.