

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.07.006

bFGF 对热射病大鼠模型 ET21, VWF, VEGF 水平的影响 *

叶建新 林 航 穆军山[△] 崔晓萍 林 敏

(南京军区福州总医院神经内科(福建医科大学福总临床医学院神经内科) 福建 福州 350025)

摘要 目的:研究碱性成纤维细胞生长因子(basic Fibroblast growth factor, bFGF)对热射病大鼠模型 ET21、VWF、VEGF 水平的影响。**方法:**选择 SD 大鼠 36 只随机分为 6 组,每组个 6 只,建立热射病大鼠模型后分为模型组、常温组、常温 bFGF 组、降温组、降温 bFGF 组,建模后 0 h、2 h,比较不同级别生命征、血管功能因子。**结果:**建模后 0 h,模型组 Tr、HR、RR、MAP 明显高于空白组($P<0.05$);建模后 2 h,常温 bFGF 组、降温 bFGF 组明显低于常温组、降温组,降温组、降温 bFGF 组明显低于常温组、常温 bFGF 组($P<0.05$)。建模后 0 h,模型组 ET21、VWF 的含量均明显高于空白组,VEGF 含量明显低于热空白组($P<0.05$);建模后 2 h,常温组 ET21、VWF 明显升高,VEGF 明显降低,常温 bFGF 组、降温组、降温 bFGF 组 ET21、VWF 明显降低,VEGF 明显升高($P<0.05$);降温组、降温 bFGF 组 ET21、VWF 明显低于常温组、常温 bFGF 组,VEGF 明显高于常温组、常温 bFGF 组($P<0.05$);常温 bFGF 组、降温 bFGF 组 ET21、VWF 明显低于常温组与降温组,VEGF 明显高于常温组与降温组($P<0.05$)。**结论:**碱性成纤维细胞生长因子有助于改善热射病大鼠生命体征,调节血管功能因子含量,提高热射病大鼠预后。

关键词:热射病;碱性成纤维细胞生长因子;内皮素;血管性假性血友病因子;血管内皮生长因子

中图分类号:R-33;R594.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)07-1225-04

Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on ET21, VWF, VEGF of Heatstroke Rats*

YE Jian-xin, LIN Hang, MU Jun-shan[△], CUI Xiao-ping, LIN Min

(Fuzhou General Hospital of Nanjing military command, Fuzhou, Fujian, 350025, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of basic fibroblast growth factor on the expression levels of ET21, VWF, VEGF in heatstroke rats. **Methods:** 36 SD rats were divided into six groups randomly into six groups of six months, the establishment of heatstroke after rats were divided into model group, normothermia group, bFGF group at room temperature, cooling group, cooling bFGF group, 0 h, 2h, compare different levels of life, vascular function factor after modeling. **Results:** After modeling 0h, model group Tr, HR, RR, MAP was significantly higher than the control group ($P<0.05$); after modeling 2 h, room temperature bFGF group and bFGF group was significantly lower than the normal temperature cooling group, cooling group, cooling group cooling bFGF group was significantly lower than the normal temperature group, normothermia bFGF group ($P<0.05$). After modeling 0 h, model group ET21, VWF levels were significantly higher than the control group, VEGF were significantly lower than the thermal control group ($P<0.05$); 2 h, normothermia group ET21, VWF significantly increased after model, VEGF significantly reduced, bFGF group at room temperature, cooling group, cooling bFGF group ET21, VWF decreased, VEGF was significantly higher ($P<0.05$); the cooling group, cooling bFGF group ET21, VWF group was significantly lower than the normal temperature, room temperature bFGF group, VEGF was significantly higher than that group room temperature, room temperature bFGF group ($P<0.05$); bFGF group at room temperature, cooling bFGF group ET21, VWF group was significantly lower than the normal temperature and cooling group, VEGF group was significantly higher than normal temperature and cooling group ($P<0.05$). **Conclusion:** Basic fibroblast growth factor help to improve vital signsthe of heatstroke rats, regulate blood vessel function factor levels, and improve the prognosis of heatstroke rats.

Key words: Heatstroke; Basic fibroblast growth factor; Endothelin; Von Willebrand factor; Vascular endothelial growth factor

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R594.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)07-1225-04

前言

热射病为过热细胞毒性与宿主全身炎症反应相互作用所

致多器官功能综合征,随着全球气候变暖、持续时间与强度的增加,热射病发病率明显增高。脑缺血缺氧是热射病中枢神经改变的主要病理生理基础^[1]。在临床实践中,针对热射病患者进

* 基金项目:南京军区医学科技创新课题基金项目(MS130)

作者简介:叶建新(1969-),女,硕士,副主任医师,主要从事脑损伤临床与基础研究工作, E-mail: 75024505@qq.com

△ 通讯作者:穆军山(1963-),男,硕士,主任医师,主要从事脑损伤临床与基础研究工作, E-mail: 342411644@qq.com, 电话: 18024027655

(收稿日期:2016-05-23 接受日期:2016-06-20)

行降温处理能够有效改善症状、保护神经功能。但是仍有部分患者会发生不可逆性神经功能损伤。这就要求在降温治疗的基础上给予必要的药物干预以保护脑血管功能、增加脑组织血供。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是具有促血管新生作用的细胞因子,能够自由通过血脑屏障并促进脑组织内新生血管和侧枝循环的形成,对于改善脑组织血供具有积极价值^[2]。本文采取建立热射病大鼠模型的方法,探讨碱性成纤维细胞生长因子对热射病大鼠血清血管收缩因子内皮素(ET21),血管性假性血友病因子(VWF),血管内皮生长因子(VEGF)水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择 SD 雄性大鼠 24 只作为实验动物,12-14 周龄,购买于福建医科大学实验动物中心(合格证号:0006914),体重 250-300 g,自由取食和饮水,室温(26±0.5)℃,相对湿度 60%±5%,2 h 昼/夜节律变化。本次实验研究报请医院动物伦理委员会批准。

1.2 试剂与仪器

碱性成纤维细胞生存因子购自珠海亿胜生物制药有限公司(国药准字:S19991021;规格 35000 IU/瓶);血清血管收缩因子内皮素(ET21),血管性假性血友病因子(VWF),血管内皮生长因子(VEGF)试剂均购自武汉博士德生物工程有限公司;模拟热气候动物舱购自南方医科大学公共卫生与热带卫生学院;低温离心机购自北京医用离心机(LDR4-8.4C 型);全自动生化分析仪购自日本日立公司(7600 型);Powlab/8sp 生理记录仪购自东乐自然基因生命科学公司。

1.3 实验动物分组及模型制备

将 36 只大鼠随机分为空白组、模型组、常温组、常温 bFGF 组、降温组、降温 bFGF 组各 6 只。空白组置于温度(26±

0.5)℃、湿度(40±5)%环境下。热射病模型建立方法如下:腹腔注射 3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉大鼠,仰卧固定于操作台上,暴露条件:温度(37.5±0.5)℃、湿度(60±5)%,核心体温达到 42.5℃表明模型建立成功^[3]。随即分为常温对照组、降温组、降温 bFGF 组,降温组给予冰块降温到热打击前核心体温。常温组、降温组经尾静脉注射生理盐水 500 μL,常温 bFGF 组、降温 bFGF 组经尾静脉注射 bFGF1 μg/500 μL,注射剂量 10 μL/只。

1.4 观察指标

1.4.1 生命体征 建模后 0 h、2 h,采用 Powlab/8sp 生理记录仪,监测直肠温度(rectal temperature, Tr)、心率(heart rate, HR)、呼吸频率(respiratory rate, RR)、平均动脉压(mean artery pressure, MAP)。

1.4.2 血管功能因子 建模后 0 h、2 h 时,采集左侧颈外静脉血 2 mL,3000 r/min 离心 10 min 取血清,采用酶联免疫吸附试验检测血清血管收缩因子内皮素 21(endothelin21, ET21)、血管性血友病因子(von Willebrand Factor, vWF),血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)含量。

1.5 统计学分析

采用 SPSS21.0 软件录入数据并进行统计学分析,多组间检验采用方差分析,两两检验采用配对 t 检验,P<0.05,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生命体征

建模后 0 h,模型组 Tr、HR、RR、MAP 明显高于空白组(P<0.05);建模后 2 h,常温 bFGF 组、降温 bFGF 组明显低于常温组、降温组,降温组、降温 bFGF 组明显低于常温组、常温 bFGF 组(P<0.05)。见表 1。

表 1 各组 Tr、HR、RR、MAP 比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of Tr, HR, RR and MAP in each group

Groups	Tr(℃)	HR(bpm)	RR(bpm)	MAP(mmHg)
Blank group	36.82±0.52	384.25±33.21	75.23±5.22	97.45±10.21
Model group	42.52±0.06 ^a	410.21±42.32 ^a	115.36±7.36 ^a	118.36±7.36 ^a
Normal temperature group				
0 h	42.55±0.07	411.21±44.32	116.21±7.54	118.54±7.36
2 h	43.62±0.08 ^b	420.36±50.32 ^b	122.35±8.12 ^b	125.36±8.12 ^b
Normal temperature bFGF group				
0 h	42.53±0.06	412.12±43.65	115.87±7.24	119.21±6.84
2 h	38.32±0.48 ^{bc}	390.25±36.25 ^{bc}	88.21±6.12 ^{bc}	105.21±5.65 ^{bc}
Cooling group				
0 h	42.52±0.05	413.12±45.32	116.24±6.58	118.65±6.85
2 h	37.65±0.06 ^{bd}	416.32±43.25 ^{bd}	118.36±6.52 ^{bd}	120.32±7.12 ^{bd}
Cooling bFGF group				
0 h	42.54±0.06	413.52±44.36	117.21±7.21	118.58±6.12
2 h	35.32±0.05 ^{bde}	386.12±33.45 ^{bde}	80.25±5.45 ^{bde}	100.25±5.14 ^{bde}

Note: group and blank compared, ^aP<0.05; and modeling 0 h compared, ^bP<0.05; modeling after 2 h at room temperature in the bFGF group and normothermia group compared, ^cP<0.05; modeling after 2 h cooling bFGF group and hypothermia group compared, ^dP<0.05; modeling after 2 h cooling group, cooling bFGF group and normal group and bFGF in normal temperature group comparison, ^eP<0.05.

2.2 细胞因子

建模后 0 h, 模型组 ET21、VWF 的含量均明显高于空白组, VEGF 含量明显低于热空白组($P<0.05$); 建模后 2 h, 常温组 ET21、VWF 明显升高, VEGF 明显降低, 常温 bFGF 组、降温组、降温 bFGF 组 ET21、VWF 明显降低, VEGF 明显升高($P<0.05$); 降温组、降温 bFGF 组 ET21、VWF 明显低于常温组、常温 bFGF 组, VEGF 明显高于常温组、常温 bFGF 组($P<0.05$); 常温 bFGF 组、降温 bFGF 组 ET21、VWF 明显低于常温组与降温组, VEGF 明显高于常温组与降温组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组 ET21、VWF、VEGF 含量比较($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Comparison of ET21, VWF and VEGF contents in each group

Group	ET21 (ng/mL)	VWF (ng/mL)	VEGF (ng/mL)
Blank group	43.96 $\pm$ 11.65	32.54 $\pm$ 4.95	215.48 $\pm$ 26.42
Model group	105.52 $\pm$ 11.52 ^a	98.62 $\pm$ 9.12 ^a	90.52 $\pm$ 9.15 ^a
Normal temperature group			
0h	102.14 $\pm$ 12.44	95.62 $\pm$ 9.62	93.15 $\pm$ 10.18
2h	119.48 $\pm$ 12.65 ^b	101.36 $\pm$ 9.33 ^b	87.36 $\pm$ 8.26 ^b
Normal temperature bFGF group			
0h	105.36 $\pm$ 11.32	96.12 $\pm$ 9.12	92.32 $\pm$ 7.56
2h	95.36 $\pm$ 9.21 ^{bc}	72.45 $\pm$ 7.24 ^{bc}	121.21 $\pm$ 10.32 ^{bc}
Cooling group			
0h	107.45 $\pm$ 13.12	97.54 $\pm$ 10.22	91.14 $\pm$ 9.67
2h	77.68 $\pm$ 9.65 ^{bd}	59.54 $\pm$ 6.39 ^{bd}	135.63 $\pm$ 12.45 ^{bd}
Cooling bFGF group			
0h	104.24 $\pm$ 11.81	99.18 $\pm$ 10.59	90.33 $\pm$ 9.28
2h	49.55 $\pm$ 5.776 ^{bde}	37.33 $\pm$ 4.14 ^{bde}	182.75 $\pm$ 17.38 ^{bde}

Note: group and blank compared, ^a $P<0.05$; and modeling 0h compared, ^b $P<0.05$; modeling after 2H at room temperature in the bFGF group and normothermia group compared, ^c $P<0.05$; modeling after 2H cooling bFGF group also cooling group, ^d $P<0.05$; modeling after 2H cooling group, cooling bFGF group and normal group, compared with normal bFGF group, ^e $P<0.05$.

3 讨论

中枢神经系统异常是热射病最常见的症状,而脑缺血缺氧是热射病中枢神经改变的主要病理生理基础。血管内皮细胞损伤和弥散性微血管血栓形成是热射病的一个突出特点。血管内皮改变可能是热射病的一个重要病理机制。脑血流量减少,局部供血不足,影响相应区域功能。海马、前额叶、颞叶、大脑皮质的神经元对缺血十分敏感,而这些区域是与学习记忆能力密切相关的脑区^[9]。这些脑区细胞的损害必然会引起以学习记忆能力下降为主的痴呆症状^[5,6]。热射病尽管给予快速降温治疗,仍有 30 % 的热射病痊愈患者留有永久性的精神神经病学损伤。因此,在处理热射病时,需要在快速降温的同时给予必要的药物治疗^[7,8]。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是血管生长因子家族的成员,具有广泛的生物学作用^[9,10]。bFGF 具有显著的促血管新生作用,能够刺激血管内皮细胞、血管平滑肌细胞以及成纤维细胞增殖、迁移、黏附,诱导新生血管形成、促进侧枝循环建立。此外, bFGF 还能够扩张脑血管、增加脑组织血流。由于 bFGF 能够通过血脑屏障,因此通过注射的方式给予 bFGF 后,该细胞因子能够作用于中枢神经系统并发挥促进血管新生的作用,改善脑组织血流量减少、供血不足的病理状态^[11,12]。

目前研究表明,决定热射病预后为体温高于危险极值的时间段,如果能够在 30 min 内将患者体温迅速降至 40 °C 以下,可增加存活几率^[13]。迅速降温与器官功能支持是治疗热射病的主要原则^[14,15]。本文研究中,热射病模型大鼠直肠温度(Tr)、心

率(HR)、呼吸频率(RR)、平均动脉压(MAP)均明显高于空白对照组,建模后 2 h,降温组、降温 bFGF 明显低于常温组、常温 bFGF 组,一则提示热射病大鼠模型建模成功,二则提示降温有助于迅速控制体温,Leon 等^[16]也有类似的文献报道。进一步分析表明, 常温 bFGF 组、降温 bFGF 组对于控制热射病大鼠温度、心率、呼吸频率、平均动脉压优于常温组与降温组,提示碱性成纤维细胞生长因子有助于改善生命体征。

热射病中枢神经系统异常最为突出,脑缺血缺氧是热射病中枢神经改变的主要病理生理基础。本研究在快速降温的同时给予碱性成纤维细胞生长因子进行干预,旨在发挥碱性成纤维细胞生长因子对血管新生的促进作用,进而改善热射病病程中脑组织供血不足的病理状态。在热射病的病理进程中,ET21 具有强烈的血管收缩作用,能够造成脑血管收缩、血流量不足; VWF 被视为内皮损伤以及功能障碍的标志物,会造成血小板聚集并导致微血管栓塞。ET21 和 VWF 能够促进热射病神经损伤的病理进程^[17,18]。VEGF 则是具有促血管新生作用和内皮保护作用的细胞因子,在热射病神经损伤过程中起到保护作用^[19,20]。本文研究中,降温组、降温 bFGF 组大鼠血清中 ET21、VWF 的含量均低于常温组、常温 bFGF 组, VEGF 明显高于常温组、常温 bFGF 组,且常温 bFGF 组、降温 bFGF 组与常温组、降温组之间差异也有统计学意义。提示在降温处理的基础上给予 bFGF 进行能够调节血管功能相关分子的含量,起到减轻脑血管损伤的作用。但是,有学者研究表明 bFGF 并不能对热射病大鼠模型的 ET21、VWF 的水平产生影响,与其进行比较,发

现,本次研究的分组更加详细,分为常温组和降温组,进行了更加深水平的研究,使得实验条件更加敏感和准确,这也是本文的创新之处。

综上所述,碱性成纤维细胞生长因子有助于改善热射病大鼠生命体征,调节血管功能因子含量,提高热射病大鼠预后。在热射病病理过程中,伴随着 ET21 和 VWF 含量上升,而 VEGF 含量降低的现象,这对于研究热射病致病机理提供了新的思路。因可供参考文献资料较少,且未对不同组别预后进行分析,可能会影响到结果的准确性,有待于更多的基础研究和临床研究去证实。

参考文献(References)

- [1] 帅军,郭进强,覃旻,等.劳力型与居民型热射病大鼠模型的比较[J].热带医学杂志,2014,14(4): 426-429
Shuai Jun, Guo Jin-qiang, Qin Min, et al. The comparison of exertional and classic heat stroke rat models [J]. Journal of Tropical Medicine, 2014, 14(4): 426-429
- [2] Wang Q, Ishikawa T, Michiue T, et al. Evaluation of human brain damage in fatalities due to extreme environmental temperature by quantification of basic fibroblast growth factor (bFGF), glial fibrillary acidic protein (GFAP), S100 β and single-stranded DNA (ssDNA) immunoreactivities[J]. Forensic Sci Int, 2012, 219(1-3): 259-264
- [3] Bouclama A, Roberts G, Al Mobanna F, et al. Inflammatory, hemostatic, and clinical changes in a baboon experimental model for heatstroke [J]. J Appl Physiol, 2005, 98(2): 697-705
- [4] 张进进,王恒,房效莉,等.热射病大鼠的学习记忆功能研究[J].中国康复理论与实践,2015,21(3): 272-275
Zhang Jin-jin, Wang Heng, Fang Xiao-li, et al. Learning and Memory Function of Rats after Heat Stroke [J]. Chinese Journal of Rehabilitation Theory and Practice, 2015, 21(3): 272-275
- [5] 陈芳,李慧敏,朱果果,等.丹参酮II A 磺酸钠对经典型热射病大鼠的保护机制[J].华中科技大学学报(医学版),2015,(6): 661-666
Chen fang, Li hui-min, Zhu Guo-guo, et al. Protective mechanism of Salvia miltiorrhiza A sulfonate sodium on classical heat injection rats [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Science Edition), 2015, (6): 661-666
- [6] 张进进,王恒,房效莉,等.热射病大鼠的学习记忆功能研究[J].中国康复理论与实践,2015,(3): 272-275
Zhang Jin-jin, Wang Heng, Fang Xiao-li, et al. Study on learning and memory function of heat stroke rats [J]. Chinese Rehabilitation Theory and Practice, 2015, (3): 272-275
- [7] Fushimi Y, Taki H, Kawai H, et al. Abnormal hyperintensity in cerebellar efferent pathways on diffusion-weighted imaging in a patient with heat stroke [J]. Clin Radiol, 2012, 67(4): 389-392
- [8] 陈伟,张旭东,逯卓卉,等.雷公藤内酯醇对佐剂性关节炎大鼠脊髓和背根神经节中白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 表达的影响及其与镇痛的关系[J].中国老年学杂志,2016,(4): 808-810
Chen Wei, Zhang Xu-dong, Lu Zhuo-hui, et al. Effects of resveratrol on interleukin 1, tumor necrosis factor alpha expression in spinal cord and dorsal root ganglia of adjuvant arthritis rats and its relationship with analgesia [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2016, (4): 808-810
- [9] 高松哲,陈剑,王彦平,等.碱性成纤维细胞生长因子对体外培养人羊膜间充质干细胞增殖的影响[J].热带医学杂志,2011,11(5): 543-545
Gao Song-zhe, Chen Jian, Wang Yan-ping, et al. Effect of bFGF on the in vitro proliferation of human amniotic mesenchymal stem cells [J]. Journal of Tropical Medicine, 2011, 11(5): 543-545
- [10] 刘晓东,王江栓,曹靖,等.氟代柠檬酸对神经病理性疼痛镜像痛大鼠行为学及星形胶质细胞激活的影响[J].解剖学杂志,2016,39(1): 69-72
Liu Xiao-dong, Wang Jiang-shuan, Cao Jing, et al. Effect of fluorocitrate on neuropathic pain mirror-image pain behavior of rats and astrocyte activation[J]. Journal of Anatomy, 2016, 39(1): 69-72
- [11] 叶建新,林航,穆军山,等.碱性成纤维细胞生长因子对血管性痴呆大鼠海马胆碱能神经元的影响[J].脑与神经疾病杂志,2012,20(1): 5-9
Ye Jian-xin, Lin Hang, Mu Jun-shan, et al. Effect of bFGF on the cholinergic neurons in hippocampus of vascular dementia rats [J]. Journal of Brain and Nervous Diseases, 2012, 20(1): 5-9
- [12] 乔鸿飞,张巧俊,袁海峰,等.超短波对糖尿病大鼠溃疡创面碱性成纤维细胞生长因子表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志,2015,37(9): 653-657
Qiao Hong-fei, Zhang Qiao-jun, Yuan Hai-feng, et al. Effect of ultra-short wave on diabetic rat ulcer basic fibroblast growth factor expression[J]. Chinese Journal of physical medicine and rehabilitation,2015, 37(9): 653-657
- [13] Casa DJ, Armstrong LE, Kenny GP, et al. Exertional heat stroke: new concepts regarding cause and care[J]. Curr Sports Med Rep, 2012, 11(3): 115-123
- [14] 李棋,李箭.碱性成纤维细胞生长因子及纤维蛋白胶在骨科的运用[J].中国组织工程研究,2015,(12): 1931-1937
Li Qi, Li Jian. Basic fibroblast growth factor and fibrin glue in the Department of orthopedics [J]. Research on Chinese Organizational Engineering, 2015, (12): 1931-1937
- [15] 杨文超,高铁婴,胡婕,等.水浴降温与室温降温对热打击大鼠肺组织损伤及预后影响的比较 [J]. 解放军医学院学报,2015,36(3): 262-266
Yang Wen-chao, Gao Tie-ying, Hu Jie, et al. Comparison of effects and prognosis of ice water immersion and room temperature cooling treatments on lung inflammation in heat-induced rats [J]. Academic Journal of Chinese PLA Medical School, 2015, 36(3): 262-266
- [16] Leon LR, Dineen S, Blaha MD, et al. Attenuated thermoregulatory, metabolic, and liver acute phase protein response to heat stroke in TNT receptor knockout mice [J]. Am J Physiol Regul Integr COMP Physiol, 2013, 305(12): R1421-R1432
- [17] 李清华, 罗尔敏, 包红, 等.血管性认知功能障碍患者测定可溶性 CD40 配体、同型半胱氨酸和内皮素-1 临床意义 [J]. 临床荟萃, 2013, 28(10): 1098-1100
Li Qing-hua, Luo Er-min, Bao Hong, et al. Clinical significance of soluble CD40 ligand, homocysteine, endothelin-1 in patients with vascular cognitive impairment [J]. Clinical Focus, 2013, 28 (10): 1098-1100
- [18] 鞠晓华,谢宝明,张金彪.2 型糖尿病并发脑梗死患者联合检测血浆 vWF 水平及血小板参数的临床价值[J].实用临床医药杂志,2014,18(16): 22-24
Ju Xiao-hua, Xie Bao-ming, Zhang Jin-biao. Clinical value of combined detection of plasma vWF and platelet parameters in patients with type 2 diabetes mellitus complicated with cerebral infarction[J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2014, 18(16): 22-24