

УДК 616.37-002.1-092.9: 615-099:547.262]-088.9-085

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕСТРУКТИВНОМ ПАНКРЕАТИТЕ В УСЛОВИЯХ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

© Бушмина О.Н.¹, Локтионов А.Л.², Долгарева С.А.¹, Прокопенко Л.Г.¹, Чуева Т.В.³

¹ Кафедра биохимии, ² кафедра хирургических болезней № 2, ³ кафедра анатомии человека
Курского государственного медицинского университета, Курск

E-mail: ala-loc@yandex.ru

При экспериментальном остром деструктивном панкреатите в условиях хронической алкогольной интоксикации установлено развитие цитолитического, холестатического, печеночно-клеточной недостаточности биохимических синдромов поражения гепатоцитов, активация процессов перекисного окисления липидов и свертывающей системы крови, увеличение уровня стабильных метаболитов оксида азота, снижение общего количества эритроцитов и их сорбционных показателей. Применение на этом фоне сочетания гепона, гипоксена и фосфоглива нормализовало 22,2% и корригировало 38,9% из измененных лабораторных показателей, комбинации глутоксима, мексидола и гептрала соответственно 66,7% и 3,4%.

Ключевые слова: метаболические нарушения, острый деструктивный панкреатит, хроническая алкогольная интоксикация, фармакологическая коррекция.

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF METABOLIC DISORDERS IN EXPERIMENTAL DESTRUCTIVE PANCREATITIS IN TERMS OF ALCOHOL INTOXICATION

Bushmina O.N.¹, Loktionov A.L.², Dolgareva S.A.¹, Prokopenko L.G.¹, Chueva T.V.³

¹ Department of Biochemistry, ² Department of Surgical Diseases N 2, ³ Department of Human Anatomy
of Kursk State Medical University, Kursk

In experimental acute destructive pancreatitis in chronic alcohol intoxication it was revealed the development of cytolytic, cholestatic, hepatocellular failure biochemical syndromes of hepatocyte destruction, activation of lipid and blood coagulation peroxidation, increase in stable nitric oxide metabolite levels, decrease in the total number of erythrocytes and their sorption performance. Against this background the combined administration of Hepon, Hypoxenum and Phosphoglive normalized 22.2% and corrected 38.9% of the changed laboratory parameters, and the combined administration of Glutoxim, Mexidolum and Heptral - 66.7% and 3.4% respectively.

Keywords: metabolic disorders, acute destructive pancreatitis, chronic alcohol intoxication, pharmacological correction.

Разработка современных методов лечения острого панкреатита (ОП) не теряет своей актуальности, поскольку все еще высокими остаются показатели летальности при этом заболевании [16, 18]. Течение и исход ОП во многом зависят от иммунной системы, участвующей в поддержании физиологического гомеостаза, регуляции метаболизма и регенерации тканей [8, 22, 24]. Исходя из этого, в стратегии коррекции нарушений гомеостаза при ОП значительную роль должны играть иммуномодулирующие препараты [4, 19]. Однако основным недостатком большинства существующих схем фармакотерапии ОП является то, что они не учитывают наличие фоновой патологии, во многом являющейся основополагающей и выполняющей роль преморбидного фона, а именно желчнокаменная болезнь, алиментарные факторы, злоупотребление алкоголем, причем последнее само по себе может быть причиной развития токсического поражения печени и иммунных нарушений [2, 3, 17]. Известно, что при ОП или при воздействии этанола патофизиологические изменения в первую очередь развиваются в поджелу-

дочной железе, печени, иммунной системе, головном мозге, эритроцитах, что проявляется значительными сдвигами соответствующих параметров гомеостаза [5, 10, 14]. В то же время исследования, в том числе экспериментальные, по изучению иммунометаболических нарушений и их коррекции при ОП на фоне хронической алкогольной интоксикации малочисленны, хотя изменения при этом сочетании создают негативный фон для формирования осложнений при деструктивных формах ОП и, как следствие, его неблагоприятных исходов.

Исходя из этого, целью исследования стала оценка фармакологической эффективности различных сочетаний иммуномодуляторов, антиоксидантов и мембранопротекторов в коррекции метаболических нарушений при экспериментальном остром панкреатите на фоне хронической алкогольной интоксикации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на 108 здоровых половозрелых крысах Вистар массой 150-200 г. Все исследования проводили в одно и то же время суток с 8 до 12 ч., содержание и забой животных проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986), и согласно правилам лабораторной практики РФ (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.). Хроническую алкогольную интоксикацию (ХАИ) моделировали 30-кратным, через 24 часа, внутрижелудочным введением 20% раствора этанола в дозе 3 мл/кг. Экспериментальный острый деструктивный панкреатит (ОДП) вызывали на 25 день после введения этанола перевязкой протока левой и правой долей поджелудочной железы, с последующей трехкратной через 60 мин стимуляцией перерезом в дозе 0,2 мг/кг.

Экспериментальных животных делили на 3 равные части: в 1-й группе фармакологические препараты не вводили; 2-я группа получала гепон (5 мг/кг, внутрь, через 24 часа, № 14), гипоксен (750 мг/кг, внутрь в 1% крахмальной суспензии, № 14) и фосфоглив (800 мг/кг, внутрь в 1% крахмальной суспензии, № 14); 3-я группа – глутоксим (20 мг/кг, внутримышечно, через 24 часа, № 5), мексидол (50 мг/кг внутривентриально, через 24 часа, № 5) и гептрал (760 мг/кг, внутривентриально, через 24 часа, № 5).

Выведение животных из эксперимента осуществляли через 24 часа после последнего введения этанола и препаратов. Группа контроля состояла из 15 здоровых животных.

Для оценки функционального состояния гепатоцитов в плазме крови стандартными наборами реактивов определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гаммаглутаминтранспептидазы (ГГТП), билирубина, протромбинового индекса (ПТИ). Концентрацию фибриногена исследовали методом Рутберг [15].

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов оценивали по содержанию ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА) в плазме крови и эритроцитах [21]. Кроме этого определяли активность каталазы [11] и супероксиддисмутазы (СОД) [12]. Общую антиокислительную активность (ОАА) плазмы крови определяли методом, основанным на степени ингибирования аскорбат- и ферроиндуцированного окисления твина-80 до МДА [6]. Концентрацию стабильных метаболитов оксида азота ($СМ_{NO}$)

исследовали спектрофотометрически с помощью реактива Грисса [7].

Подсчет общего количества эритроцитов и содержания гемоглобина проводили по общепринятым методикам. Определяли сорбционную способность эритроцитов (ССЭ) [23] и сорбционную емкость их гликокаликса (СЕГ) [20]. О метаболическом состоянии эритроцитов судили по внутриклеточной концентрации МДА, АГП и активности СОД.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась путем вычисления средних арифметических, стандартных ошибок и ошибок средних. Существенность различий средних величин оценивали по критерию Стьюдента [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У крыс с ОДП на фоне 30-дневной хронической алкогольной интоксикации наблюдалось развитие цитолитического синдрома (повышение концентрации АЛТ и билирубина), холестатического (повышение содержания ЩФ и ГГТП), синдрома печеночно-клеточной недостаточности (снижение синтеза фибриногена) при активации свертывающей системы крови (повышение ПТИ). Полученные результаты свидетельствуют о выраженном нарушении функциональной активности гепатоцитов, повышение уровня ПТИ можно расценивать как маркер системных воспалительных изменений на фоне острого деструктивного панкреатита (табл. 1).

Введение экспериментальным животным с ОДП на фоне 30-дневной интоксикации этанолом сочетания гепона, гипоксена и фосфоглива корригировало, но не до уровня здоровых животных, содержание АЛТ, ЩФ, билирубина, не влияя на измененные концентрации в плазме крови ГГТП, ПТИ и фибриногена. Комбинация глутоксима, мексидола и гептрала была более эффективна, поскольку нормализовала в крови уровень ЩФ, билирубина, ПТИ, фибриногена и корригировала активность АЛТ и ГГТП (табл. 1).

Кроме этого, установлено увеличение уровня $СМ_{NO}$, развитие «окислительного стресса» (повышение содержания МДА, АГП, снижение факторов антиоксидантной защиты – каталазы, СОД и ОАА) (табл. 2). Сочетание гепона, гипоксена и фосфоглива нормализовало ОАА, активность каталазы, корригировало, но не до показателей интактных крыс, концентрацию АГП, $СМ_{NO}$, активность СОД. Совместное введение глутоксима, мексидола и гептрала нормализовало уровень АГП, $СМ_{NO}$, активность СОД, корригировало содержание МДА, повышало ОАА и активность каталазы (табл. 2).

Таблица 1

Коррекция нарушений функциональной активности гепатоцитов при ЭОП на фоне 30-дневной ХАИ

Показатели	Единицы измерения	1	2	3	4
		Контроль	ЭОП на фоне 30-дневной ХАИ		
			Без введения препаратов	Введение гепона, гипоксена и фосфоглива	Введение глутоксима, мексидола и гептрала
АЛТ	Е/л	20,1±2,38	51,67±11,9 ^{*1}	37,57±5,51 ^{*1,2}	26,7±1,5 ^{*1-3}
ЩФ	Е/л	249,2±18,8	472,3±16,6 ^{*1}	328,7±23,2 ^{*1,2}	267,0±49,8 ^{*2,3}
ГГТП	Е/л	4,8±0,22	28,83±1,56 ^{*1}	30,4±2,52 ^{*1}	14,8±1,5 ^{*1-3}
Билирубин	мкмоль/л	5,74±1,18	16,38±1,61 ^{*1}	11,05±2,23 ^{*1,2}	6,6±1,13 ^{*2,3}
ПТИ	%	60,1±1,63	70,2±2,27 ^{*1}	69,8±2,27 ^{*1}	59,0±3,57 ^{*2,3}
Фибриноген	г/л	3,12±0,09	2,55±0,13 ^{*1}	3,85±0,24 ^{*1}	3,05±0,25 ^{*2,3}

Примечание: здесь и на последующих таблицах: * – $p=0,05$, цифра рядом со звездочкой указывает, по отношению к показателю какой группы различия достоверны.

Таблица 2

Коррекция уровня стабильных метаболитов оксида азота, состояния перекисного окисления липидов и факторов антиоксидантной защиты при ЭОП на фоне 30-дневной ХАИ

Показатели	Единицы измерения	1	2	3	4
		Контроль	ЭОП на фоне 30-дневной ХАИ		
			Без введения препаратов	Введение гепона, гипоксена и фосфоглива	Введение глутоксима, мексидола и гептрала
МДА	мкмоль/л	2,15±0,32	3,89±0,07 ^{*1}	3,79±0,21 ^{*1}	2,55±0,11 ^{*1-3}
АГП	усл. ед.	0,21±0,05	0,63±0,03 ^{*1}	0,43±0,08 ^{*1,2}	0,19±0,007 ^{*2,3}
ОАА	%	40,33±1,12	37,85±0,71 ^{*1}	42,75±1,2 ^{*2}	44,3±1,31 ^{*1-3}
СОД	усл. ед./мл	9,03±0,51	6,14±0,38 ^{*1}	8,02±0,28 ^{*1,2}	9,21±0,32 ^{*2,3}
Каталаза	мкат/л	11,31±0,62	9,2±0,72 ^{*1}	11,2±0,55 ^{*2}	13,83±0,7 ^{*1-3}
СМ _{NO}	мкмоль/л	6,84±0,29	3,77±0,46 ^{*1}	4,58±0,24 ^{*1,2}	7,08±0,55 ^{*2,3}

Таблица 3

Метаболическая активность эритроцитов периферической крови при ЭОП на фоне 30-дневной ХАИ

Показатели	Единицы измерения	1	2	3	4
		Контроль	ЭОП на фоне 30-дневной ХАИ		
			Без введения препаратов	Введение гепона, гипоксена и фосфоглива	Введение глутоксима, мексидола и гептрала
Кол-во эритроцитов	10 ¹² /л	5,09±0,08	3,98±0,14 ^{*1}	4,23±0,14 ^{*1}	4,93±0,07 ^{*2,3}
Нб	г/л	13,5±0,35	13,45±0,46	15,2±0,47 ^{*1,2}	13,2±0,22 ^{*3}
МДА	мкмоль/л	0,37±0,06	0,55±0,07 ^{*1}	0,41±0,04 ^{*2}	0,36±0,03 ^{*2}
АГП	усл. ед.	0,13±0,01	0,29±0,02 ^{*1}	0,32±0,02 ^{*1}	0,15±0,002 ^{*2,3}
СОД	усл. ед./мл	30,1±1,37	15,25±0,65 ^{*1}	14,0±0,56 ^{*1}	25,3±1,04 ^{*1-3}
СЕЭ	%	52,51±0,55	21,89±1,06 ^{*1}	51,7±2,26 ^{*2}	54,0±2,1 ^{*2}
СЕГ	10 ¹² г/эр	2,78±0,03	1,37±0,18 ^{*1}	3,4±0,13 ^{*1,2}	2,66±0,22 ^{*2,3}

При оценке эритроцитарных показателей установлено, что в условиях ОДП и 30-дневного введения этанола наблюдается снижение общего количества эритроцитов, активация процессов перекисного окисления липидов (повышение уровня МДА, АГП, снижение активности СОД), снижение сорбционных показателей (СЕЭ и СЕГ)

при нормальном уровне Нб (табл. 3). Введение экспериментальным животным комбинации гепона, гипоксена и фосфоглива нормализует СЕЭ, концентрацию МДА, но повышает относительное содержание Нб и СЕГ. Сочетанное применение глутоксима, мексидола и гептрала оказалось наиболее эффективным, так как нормализует

Таблица 4

Эффективность различных сочетаний иммуномодуляторов, антиоксидантов и мембранопротекторов в условиях ОДП на фоне 30-дневной алкогольной интоксикации

№ п/п	Группа животных	Измененные лаборатор- ные показатели без кор- рекции препаратами (%)	Лабораторные показатели после коррекции препа- ратами (%), из них:		
			нормализованы	корригированы	не изменились
Показатели функциональной активности гепатоцитов					
1.	Гепон, гипоксен, фосфоглив	100	0	50	50
2.	Глутоксим, мексидол, гептрал		66,7	33,3	0
Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты					
1.	Гепон, гипоксен, фосфоглив	100	33,3	50	16,7
2.	Глутоксим, мексидол, гептрал		50	50	0
Эритроцитарные показатели					
1.	Гепон, гипоксен, фосфоглив	85,7	33,3	16,7	50
2.	Глутоксим, мексидол, гептрал		83,3	16,7	0
Все исследованные лабораторные показатели					
1.	Гепон, гипоксен, фосфоглив	94,7	22,2	38,9	38,9
2.	Глутоксим, мексидол, гептрал		66,7	33,3	0

общее количество эритроцитов, внутриклеточную концентрацию МДА, АГП, сорбционные показатели (СЕЭ и СЕГ), корректирует активность эритроцитарной СОД (табл. 3).

Анализируя полученные данные, представленные в таблице 4, можно заключить, что у крыс с ОДП на фоне ХАИ в различной степени было нарушенными 94,7% исследованных лабораторных показателей, характеризующих функциональную активность гепатоцитов, перекисное окисление липидов, антиоксидантную защиту, функционально-метаболическую активность эритроцитов. Введение гепона, гипоксена и фосфоглива нормализовало из измененных показателей 22,2%, корректировало 38,9% и не влияло на 38,9%. Комбинация глутоксида, мексидола и гептрала оказалась более эффективной, поскольку нормализовала 66,7% и корректировала 3,4% показателей.

Таким образом, у животных с ОДП на фоне алкогольной интоксикации наблюдается развитие основных биохимических синдромов поражения печени, что свидетельствует о токсическом поражении с активацией процесса свертываемости крови, что вероятно обусловлено развитием ОП, на фоне которого гематокрит смещается в сторону гемоконцентрации, происходит нарушение микроциркуляции и увеличивается риск развития микротромбозов во внутренних органах, в первую

очередь в сердце, головном мозге и печени. Это приводит к дисбалансу систем регуляции и может неблагоприятно сказываться на исходах заболевания. Другой стороной этого негативного процесса служат иммунные и метаболические нарушения, которые усугубляют возникающие изменения в системе крови, вызывают угнетение процессов репаративной регенерации. С учетом предшествующего опыта использования в экспериментальной и клинической практике ОП применения препаратов, обладающих иммуномодулирующей, антиоксидантной и мембранопротекторной активностью [1, 13] была избрана такая же стратегия фармакологической коррекции иммунометаболических нарушений при ОДП на фоне этанольной интоксикации. Сочетание гепона, гипоксена и фосфоглива оказалось менее эффективным по сравнению с глутоксимом, мексидолом и гептралом. В данном случае для сочетания ЭОП и алкогольной интоксикации последнее сочетание оказалось более эффективным, поскольку все три препарата обладают выраженной противовоспалительной активностью, антиоксидантными эффектами, что более предпочтительно в разгар метаболического каскада, активации процессов перекисного окисления липидов. Кроме того, основным действующим веществом гептрала и мексидола являются естественные метаболиты, биодоступность которых выше по сравнению с гипоксеном и фосфогливом. Резюмируя сказанное,

можно утверждать, что при сочетанной патологии, развивающейся на фоне преморбидного фона в виде длительного воздействия этанола, более эффективной является комбинированная фармакотерапия, позволяющая воздействовать сразу на несколько звеньев патогенеза заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азарова Ю.Э., Суняйкина О.А., Локтионов А.Л., Конопля А.И., Лазаренко В.А. Сравнительная эффективность различных способов иммуномодулирующей, мембранопротекторной и антиоксидантной фармакотерапии при остром панкреатите // Мед. иммунол. – 2011. – Т. 13, № 4-5. – С. 514-515.
2. Бровкина И.Л., Быстрова Н.А., Гаврилюк В.П., Павлова М.В. Иммунометаболические нарушения в условиях экспериментальной этанольной интоксикации // Вестн. новых мед. технол. – 2007. – Т. XIV, № 2. – С. 9-11.
3. Бровкина И.Л., Быстрова Н.А., Лосенок С.А., Лосенок, Павлова М.В., Прокопенко Л.Г. Коррекция иммунометаболических нарушений, вызываемых длительным поступлением в организм этанола, регуляторами энергетического обмена и эссенциале // Вестн. новых мед. технол. – 2007. – Т. XIV, № 3. – С. 202-205.
4. Верхулецкий И.Е., Синепупов Н.А., Синепупов Д.Н., Медведев А.Ф., Пилюгин Г.Г., Осипов А.Г. Иммуноориентированная терапия в комплексном лечении острого панкреатита // Украинский журнал хирургии. – 2011. – Т. 4, № 13. – С. 154-160.
5. Гаврилюк В.П., Назаренко П.М., Конопля А.И. // Структурно-функциональные нарушения эритроцитов и их коррекция у больных с легким и тяжелым течением острого панкреатита // Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2007. – № 3. – С. 38-42.
6. Галактионова Л.П., Молчанов А.В., Ельчанинова С.А., Варшавский Б.Я. Состояние перекисного окисления липидов у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки // Клинич. лаб. диагностика. – 1998. – № 6. – С. 10-14.
7. Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Картавенко В.И., Мусселиус С.Г., Олейникова О.Н. Генерация оксида азота лейкоцитами периферической крови в норме и при патологии // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2003. – № 4. – С. 11-13.
8. Горский В.А., Агапов М.А., Хорева М.В. Синдром системной воспалительной реакции и возможный путь коррекции при остром панкреатите. // Врач. – 2014. – № 7. – С. 47-49.
9. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Л. : Медицина, 1973. – 103 с.
10. Конопля А.И., Лазаренко В.А., Локтионов А.Л. Взаимосвязь иммунометаболических и эритроцитарных нарушений с этиологией острого панкреатита. – Курск : Изд-во ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, 2013. – 162 с.
11. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
12. Костюк В.А., Потапов А.Н., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. – 1990. – № 2. – С. 88-91.
13. Локтионов А.Л., Лазаренко В.А., Долгарева С.А., Прокопенко Л.Г. Влияние сочетанного применения «Ферровира», «Мексидола» и «Фосфоглива» на структурно-функциональные свойства эритроцитов при остром билиарном и небилиарном панкреатите // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2011. – № 4. – С. 124-129.
14. Локтионов А.Л., Уханова И.Ю., Ликов В.Ф., Конопля А.И., Суняйкина О.А., Караулов А.В. Цитокинпродуцирующая активность перитонеальных макрофагов в зависимости от этиологии острого панкреатита // Иммунол. – 2010. – № 6. – С. 321-325.
15. Люблина А.Я., Ильичева Л.П., Катасонова Т.В., Петросова С.А. Клинические лабораторные исследования. – М. : Медицина, 1984. – 288 с.
16. Охотников О.И., Иванов И.С., Розберг Е.П., Плотников Р.В. Новые подходы к лечению панкреонекроза // Курский науч.-практ. вестн. «Человек и его здоровье». – 2000. – № 3. – С. 23-25.
17. Пирогова И.Ю., Пономарева И.Ю., Сеницын С.П., Самохина Е.П., Горбунова А.С., Старцева Е.Ю., Чулков В.С., Кондратьева Т.Ф. Исходы токсических гепатитов, вызванных суррогатами алкоголя // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2013. – № 6. – С. 49-56.
18. Савельев В.С., Гельфанд Б.Р., Мишнев О.Д., Щеголев А.И. Хирургический сепсис: клинко-патологоанатомические аспекты // Арх. патологии. – 2007. – Т. 69, № 4. – С. 59-63.
19. Саганов В.П., Хитрихеев В.Е., Жигаев Г.Ф., Цыбилов Е.Н., Гунзынов Г.Д. Иммунодиагностика и иммунотерапия при остром деструктивном панкреатите // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2009. – Т. 3, № 67. – С. 368.
20. Семко Г.А. Структурно-функциональные изменения мембран и внешних примембранных слоев эритроцитов при гиперэпидермопозе // Украинский биохимический журнал. – 1998. – Т. 70, № 3. – С. 113-118.
21. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 66-68.
22. Тарасенко В.С., Кубышкин В.А., Демин Д.Б., Волков Д.В., Смолягин А.И., Чукина О.В. Иммунологические нарушения при панкреонекрозе и их коррекция // Хирургия. – 2013. – № 1. – С. 88-95.
23. Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В. Способ диагностики эндогенной интоксикации // Лабораторное дело. – 1988. – № 9. – С. 22-24.
24. Уханова И.Ю., Караулов А.В., Конопля А.И., Локтионов А.Л., Суняйкина О.А. Функциональная активность перитонеальных макрофагов при остром деструктивном панкреатите: оценка, значение // Клинич. лабор. диагн. – 2011. – № 6. – С. 42-44.