

## ارزیابی فرایند انفجار تنفسی سیستم فاگوسیتی (نوتروفیل و مونوسیت) در افراد دیابتی نوع ۲ با استفاده از محرکهای PMA و fmlp

باقر لاریجانی: استاد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، بیمارستان شریعتی، بخش غدد  
نریمان مصفا: دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی، گروه ایمونولوژی  
پیمان شوشتری زاده\*: کارشناس ارشد ایمونولوژی، محقق مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران  
مهدی نورایی: استادیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، گروه پزشکی اجتماعی  
ابراهیم جوادی: استادیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران، گروه بیوشیمی  
علیرضا شفایی: دکترای حرفه‌ای علوم آزمایشگاهی، محقق مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران  
علیرضا وثیق: پزشک عمومی، محقق مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران

### چکیده

مقدمه: دیابت یک اپیدمی نهفته و شایعترین بیماری ناشی از اختلالات متابولیسم شناخته شده است. نقص در دستگاه ایمنی ذاتی و سلولی از مواردی است که پژوهشگران نسبت به رویداد آن در این بیماری اتفاق نظر دارند، از جمله در منابع به دفعات به نقص در سیستم فاگوسیتی اشاره شده که شامل اختلال کموتاکسی، فاگوسیتوز و کشندگی (killing) بوده است. با این حال گزارشهای مربوط به اختلال در فرایند انفجار تنفسی سیستم فاگوسیتی، که از مکانیسم‌های کشندگی آنها است، ضد و نقیض می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی فرایند انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها در خون محیطی به طور جداگانه و با استفاده از دو محرک fmlp (Formyl-met-leu-phe) و PMA (Phorbol-12,13-myristate acetate) بوده است. روشها: از ۳۶ بیمار دیابتی نوع ۲ با میانگین سنی  $53 \pm 7$  سال و ۲۰ فرد سالم با میانگین سنی  $50 \pm 5$  سال، ۱۵ میلی‌لیتر خون محیطی هپارینه گرفته شد. سلولهای فاگوسیتی (نوتروفیل و مونوسیت) با استفاده از گرادیان غلظتی اختصاصی و کشت سلولی کوتاه‌مدت، به‌طور خالص (بیش از ۹۵٪) از خون محیطی جدا گردید. فرایند انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها به‌طور جداگانه به کمک آزمون NBT (Nitro blue tetrazolium) نیمه‌کمی و با استفاده از دو محرک PMA و fmlp انجام گرفت.

یافته‌ها: پس از تحریک با PMA در نوتروفیل‌های افراد دیابتی، فعالیت کمتری در فرایند انفجار تنفسی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد ( $p=0/097$ ). همچنین پس از تحریک با fmlp، نوتروفیل‌های افراد دیابتی، در مقایسه با گروه شاهد فعالیت کمتری از خود نشان دادند که این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $p=0/027$ ). برخلاف نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌های گروه دیابتی و گروه شاهد، در ارائه پاسخ به محرکها در فرایند انفجار تنفسی تفاوتی نشان ندادند. نتیجه‌گیری: برپایه نتایج به‌دست آمده، به نظر می‌رسد عدم پاسخ مناسب به محرکها و ناکارآمد بودن فرایند انفجار تنفسی سیستم فاگوسیتی، می‌تواند زمینه را برای پیدایش، تشدید و تداوم عفونتها در بیماران دیابتی فراهم سازد.

کلیدواژه‌ها: دیابت قندی، بیگانه‌خواری، انفجار تنفسی، fmlp، PMA

\*نشانی: تهران، خیابان کارگرشمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم؛ تلفن: ۰۲۶۹۰۲-۸۰

نمابر: ۰۲۹۳۹۹-۸۰؛ پست الکترونیک: emrc@sina.tums.ac.ir

## مقدمه

محیطی استفاده می‌شود که پس از جداسازی معمولاً به آنها ماکروفاژهای حاصل از مونوسیت (MDM) می‌گویند (۳). مونوسیت‌های خون محیطی واجد فعالیت فاگوسیتی و کموتاکسی هستند و پس از مهاجرت به بافت‌های گوناگون، دوباره تمایز پیدا می‌کنند و به ماکروفاژهای بافتی تبدیل می‌شوند.

## انفجار تنفسی<sup>۴</sup>

متابولیسم هواخواه (aerobic) در سلولهای فاگوسیت حرفه‌ای در حالت استراحت و پایه (تحریک نشده) ناچیز است. علی‌رغم اینکه مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها واجد میتوکندری هستند، هر دو سلول قسمت اعظم انرژی متابولیک خود را از گلیکولیز ناهواخواه (anaerobic) کسب می‌کنند. با این حال، پس از قرار گرفتن در معرض یک فعال‌کننده مناسب، شاهد مصرف انفجاری اکسیژن در این سلولها هستیم که با افزایش گلیکولیز هواخواه و تولید رادیکالهای آنیون سوپراکسید همراه است. در افراد سالم پدیده انفجار تنفسی در نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها رخ می‌دهد که همیشه با فاگوسیتوز همراه می‌باشد.

محرکهای مسیر انفجار تنفسی به دو گروه عمده تقسیم می‌گردند: محرکهایی که گیرنده آنها در سیتوپلاسم سلول است از قبیل PMA<sup>۵</sup> و دوم محرکهایی که گیرنده آنها بر سطح سلول قرار دارد مانند fmlp<sup>۶</sup>. این دو گروه هر کدام از مسیرهای آنزیمی جداگانه‌ای فعالیت انفجار تنفسی را تحریک می‌کنند (۴).

## وضعیت انفجار تنفسی در دیابت

گزارشها در مورد وضعیت انفجار تنفسی فاگوسیت‌ها در بیماران دیابتی در حالت تحریک شده متناقض است. بیشتر مطالعات بر نقص انفجار تنفسی در نوتروفیل‌های افراد دیابتی دلالت دارند (۵-۷) اما برخی از پژوهشگران در

بیماری دیابت از بیماریهای مزمن شایع در جهان است که به‌طور متفاوتی تمام نژادها را درگیر می‌سازد. این بیماری معمولاً با عوارض حاد از قبیل کتواسیدوز، کومای هیپراسمولار و عوارض مزمن از قبیل ناهنجاریهای دستگاه گردش خون، بیماریهای غیرالتهابی شبکیه، نفروپاتی و زخم پای دیابتی همراه است. برخلاف عوارض حاد، علل عوارض مزمن کاملاً مشخص نشده ولی تاکید اصلی بر مسیر polyol است، جایی که گلوکز توسط آنزیم آلدول ردوکتاز به سوربیتول احیا می‌گردد. سوربیتول در آسیب‌زایی (pathogenesis) بیشتر عوارض مزمن دیابت دخالت دارد. دومین مکانیسم که در آسیب‌زایی عوارض مزمن دیابت اهمیت بالقوه‌ای دارد گلیکوزیله شدن پروتئین‌ها است. فرآورده‌های نهایی حاصل از گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها (AGE)<sup>۱</sup> به دلیل غلظت بالای قند خون در طی واکنشهای غیرآنزیمی بین پروتئین‌ها و واسطه‌های قندی پدید می‌آیند (۱). بیماران دیابتی بیشتر از افراد سالم دچار عفونت می‌شوند که یکی از دلایل عمده آن نقص در دستگاه ایمنی این بیماران است. در بخش ایمنی ذاتی اکثر مطالعات بیانگر نقص در کارکرد دستگاه بیگانه‌خوارهای حرفه‌ای است (۲).

## بیگانه‌خوارهای حرفه‌ای

این سلولها نقش مهمی در واکنشهای دفاعی برعهده دارند. وظیفه اصلی آنها بلع میکروارگانیسم‌ها، سلولها و ذرات خارجی است. بیگانه‌خوارهای حرفه‌ای شامل نوتروفیل‌ها و سیستم بیگانه‌خواری تک‌هسته‌ای<sup>۲</sup>، شامل مونوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌باشد. نوتروفیل‌ها نخستین خط دفاعی بدن در برابر عوامل بیگانه محسوب می‌شوند. این سلولها فعالانه به سمت مواد کموتاکتیک و بیگانه مهاجرت کرده (کموتاکسی)، آنها را می‌بلعند (فاگوسیتوز) و از بین می‌برند. مونوسیت‌های خون محیطی خاصیت چسبندگی شدید به سطوح پلاستیکی و شیشه‌ای دارند و در آزمایشگاه از این خصوصیت برای جداسازی آنها از دیگر سلولهای خون

<sup>3</sup> Monocyte derived macrophages

<sup>4</sup> Respiratory burst

<sup>5</sup> Phorbol – 12, 13 – myristate acetate

<sup>6</sup> Formyl – met – leu - ph

<sup>1</sup> Advanced glycation endproducts

<sup>2</sup> Mononuclear phagocytic system

سطوح پلاستیکی استفاده شد، بدین ترتیب که لایه حاوی لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها به پلیت‌های کشت سلول منتقل گردید و به آن محیط کشت سلول F10 به همراه FCS<sup>۲</sup> ۱۰٪ اضافه شد و مدت دو ساعت در ۳۷ درجه نگهداری شد. پس از این مدت طی روند شستشو با بافر HBSS گرم، لنفوسیت‌ها از محیط خارج گردیدند. جهت بررسی خلوص سلولها از رنگ‌آمیزی NSE<sup>۳</sup> که برای مونوسیت‌ها و ماکروفاژها اختصاصی است، استفاده شد که میزان خلوص بیش از ۹۵٪ بود. در تمامی مراحل با استفاده از محلول تریپان بلو از زنده بودن سلولها اطمینان حاصل می‌شد. جهت بررسی فرایند انفجار تنفسی از آزمون نیمه‌کمی NBT<sup>۴</sup> استفاده شد (۹). برای تحریک سلولها از PMA با غلظت ۱۰ ng/ml و fmlp با غلظت ۱۰<sup>-۶</sup>M استفاده شد. از آنجایی که سلولها در حالت پایه و تحریک نشده میزان متفاوتی از انفجار تنفسی را نشان می‌دهند، از اندکس زیر جهت مقایسه و گزارش نتایج استفاده شد:

Stimulation Index=

درصد سلولهای NBT مثبت تحریک نشده - درصد سلولهای NBT مثبت تحریک شده  
درصد سلولهای NBT مثبت تحریک نشده

### یافته‌ها

براساس اندکس تحریک محاسبه شده برای نوتروفیل‌ها، میانگین (±SD) فرایند انفجار تنفسی نوتروفیل‌های افراد دیابتی پس از تحریک با PMA،  $M = 0.729 \pm 0.658$  و در گروه شاهد  $M = 0.613 \pm 0.818$  بود ( $p = 0.097$ ). همچنین پس از تحریک با fmlp این میزان در افراد دیابتی  $M = 0.597 \pm 0.498$  و در گروه شاهد  $M = 0.893 \pm 0.875$  بود ( $p = 0.027$ ). جهت مونوسیت‌ها پس از تحریک با PMA میانگین اندکس تحریک در گروه دیابتی‌ها  $M = 5.64 \pm 5.89$  و در گروه شاهد  $M = 4.88 \pm 5.78$  بود ( $p = 0.685$ )، این مقدار پس از تحریک با fmlp در گروه دیابتی‌ها  $M = 4.85 \pm 4.47$  و در گروه شاهد  $M = 4.26 \pm 4.70$

مطالعات خود تفاوتی بین گروه شاهد و بیماران مشاهده نکرده‌اند (۸، ۹). همچنین مطالعات گوناگون حاکی از نقص انفجار تنفسی در مونوسیت‌های افراد دیابتی است (۱۰، ۱۱) اما در یک مطالعه که از ZYMOSAN جهت تحریک مونوسیت‌ها استفاده شده بود، مونوسیت‌های افراد دیابتی برخلاف تصور، فعالیت انفجار تنفسی بیشتری نسبت به گروه شاهد نشان دادند (۱۲).

به نظر می‌رسد نتایج متفاوت به دلیل استفاده از محرکهای گوناگون، عدم تخلیص سلولهای بیگانه‌خوار و شیوه‌های متفاوت بررسی فرایند انفجار تنفسی باشد. در مطالعه حاضر برآن شدیم با استفاده از تکنیک‌های جداسازی و کشت سلول کوتاه‌مدت، سلولهای بیگانه‌خوار را به‌طور نسبی خالص کرده، سپس با استفاده از دو محرک FMLP و PMA که هر کدام از مسیرهای متفاوتی سلول را فعال می‌کنند، پدیده انفجار تنفسی را به‌طور جداگانه در نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌های افراد دیابتی بررسی نماییم.

### روشها

این مطالعه به‌صورت مورد-شاهدی (case-control) انجام شد. از بین بیماران دیابتی نوع ۲ مراجعه‌کننده به درمانگاه دیابت مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۳۶ بیمار به‌صورت نمونه‌گیری در دسترس، تحت بررسی قرار گرفتند. گروه شاهد شامل ۲۰ فرد سالم بود که از نظر سن و جنس با گروه بیماران تک به تک جور (match) شده بودند. از بیماران و گروه شاهد ۱۵ میلی‌لیتر خون وریدی به‌صورت هیپارینه گرفته شد. جداسازی سلولی در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول خون هیپارینه به نسبت ۱:۲ با بافر HBSS<sup>۱</sup> رقیق شد، سپس با استفاده از گرادبان غلظتی Polymorphoprep<sup>TM</sup> با وزن مخصوص ۱/۱۱۳ و پس از سانتریفوژ سه لایه سلولی به‌دست آمد که شامل گویچه‌های سرخ، نوتروفیل‌ها و لایه سلولهای تک‌هسته‌ای شامل مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها بود. لایه نوتروفیل‌ها جدا گردید و جهت جداسازی مونوسیت‌ها از لنفوسیت‌ها، از خاصیت چسبندگی آنها به

<sup>۱</sup> Hanks buffer salt solution

<sup>۲</sup> Fetal calf serum

<sup>۳</sup> Non-specific esterase

<sup>۴</sup> Nitro blue tetrazolium

بود ( $p=0/636$ ). تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ver.11 و آزمون Mann-Whitney صورت گرفت.

### جدول ۱- نتایج حاصل از آزمون NBT نیمه کمی جهت بررسی فرایند انفجار تنفسی در نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها با استفاده از محرکهای PMA و fmlp

p value	گروه دیابتی	گروه شاهد	
۰/۰۹۷	۰/۶۵۸±۰/۷۲۹	۰/۸۱۸±۰/۶۱۳	اندکس تحریکی نوتروفیل‌ها با محرک PMA (انحراف معیار ± میانگین)
۰/۰۲۷	۰/۴۹۸±۰/۵۹۷	۰/۸۷۵±۰/۸۹۳	اندکس تحریکی نوتروفیل‌ها با محرک fmlp (انحراف معیار ± میانگین)
۰/۶۸۵	۵/۸۹±۵/۶۴	۵/۷۸±۴/۸۸	اندکس تحریکی مونوسیت‌ها با محرک PMA (انحراف معیار ± میانگین)
۰/۶۳۶	۴/۴۷±۴/۸۵	۴/۷۰±۴/۲۶	اندکس تحریکی مونوسیت‌ها با محرک fmlp (انحراف معیار ± میانگین)

### بحث

از مهارکننده‌های آلدوز ردوکتاز سوربیتول است که باعث افزایش میواینوزیتول درون سلولی می‌شود. تجویز

سوربیتول یا میواینوزیتول از بروز مشکلات ناشی از دیابت جلوگیری می‌کند ولی مانع بروز نقص در انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها در اثر انکوباسیون با گلوکز (in vitro) نمی‌شود، لذا نقص نوتروفیل‌ها نمی‌تواند ناشی از متابولیسم گلوکز در مسیر آلدوز ردوکتاز باشد (۱۳).

ایزومرهای نوری گلوکز از نظر شیمیایی خواص یکسانی دارند ولی فرم D گلوکز است که سوبسترای آنزیم‌های گوناگون واقع می‌شود. از آنجایی که هم فرم D و هم فرم L گلوکز باعث نقص در کارکرد نوتروفیل‌ها می‌شوند، این نقص باید ناشی از یک فرایند غیر آنزیمی باشد. فرایند غیر آنزیمی که به‌طور عمده در عوارض دیابت دخیل بوده، گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها است. در این فرایند تنها مونوساکاریدهایی که واجد فعالیت آلدیدی هستند، از جمله گلوکز، مانوز و فروکتوز، شرکت می‌کنند. مانیتول و سوربیتول از نظر ساختمانی به ترتیب شبیه مانوز و گلوکز هستند ولی فاقد کارکرد آلدیدی می‌باشند. در مطالعات مشخص شده که گلوکز، مانوز و فروکتوز انفجار تنفسی را در نوتروفیل‌ها مهار می‌کنند ولی مانیتول و سوربیتول اثر فوق‌العاده کمی دارند لذا گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها مکانیسم اصلی ایجاد نقص در کارکرد لوکوسیت‌ها است.

سیستم بیگانه‌خواری خون محیطی شامل نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها دارای توان بالقوه‌ای در اجرای مکانیسم‌های دفاع ایمنی ذاتی هستند. در مطالعه حاضر برخلاف مطالعات پیشین (۱۰، ۱۱) نتایج و بررسی‌های آماری بیانگر عدم تفاوت سیستم انفجار تنفسی مونوسیت‌های بیماران دیابتی و گروه شاهد می‌باشد؛ اما در بررسی فرایند انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها همانند مطالعات قبلی (۵، ۷) شاهد کاهش در فرایند انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها در گروه دیابتی بودیم که این کاهش هم در حالت تحریک‌شده با PMA و هم در حالت تحریک‌شده با fmlp مشاهده گردید که در مورد fmlp تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $p = 0/027$ ).

مطالعات بیانگر این مسأله است که انکوباسیون نوتروفیل‌ها با گلوکز باعث نقص در انفجار تنفسی و کارکرد آنها می‌شود (۱۳). زمانی که بافتها با حالت هیپرگلیسمی مواجه می‌شوند، تبدیل گلوکز به سوربیتول از طریق آنزیم آلدوز ردوکتاز افزایش می‌یابد و به‌دنبال آن شاهد تجمع درون سلولی سوربیتول و فقدان میواینوزیتول خواهیم بود. از آنجایی که تحریک نوتروفیل‌ها توسط محرک‌هایی نظیر fmlp باعث القای هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول می‌شود، فقدان میواینوزیتول می‌تواند باعث نقص در پاسخ‌گویی نوتروفیل‌ها به این گونه محرک‌ها گردد. یکی

استفاده از داروهای بازدارنده روند گلیکوزیلاسیون و تشکیل AGE (مانند آمینوگوانیدین) در مطالعه‌ای مشابه، بتواند به طور یقین اثر گلیکوزیلاسیون را بر کارکرد گیرنده‌های درون و برون سلولی محرکهای مسیر انفجار تنفسی، معین نماید.

در مجموع، در این مطالعه همان‌گونه که انتظار می‌رفت در مورد مسیر با واسطه گیرنده برون‌سلولی (fmlp) نسبت به مسیر با واسطه گیرنده درون‌سلولی (PMA) شاهد کاهش شدیدتری در پاسخ به محرک بودیم که این نقص در پاسخ به محرکها در سلولهای بیگانه‌خوار افراد دیابتی، می‌تواند مسیر را جهت ابتلای به عفونتهای گوناگون هموار سازد.

به‌طور کلی تحریک انفجار تنفسی از دو مسیر اصلی برون‌سلولی و درون‌سلولی آغاز می‌شود (۴). پاره‌ای از محرکها نظیر fmlp از راه برون‌سلولی و با واسطه گیرنده غشایی و گروهی دیگر نظیر PMA با استفاده از اندورسپتورها که در سیتوپلاسم حاضرند، باعث تحریک فرایند انفجار تنفسی می‌گردند. با توجه به وجود اختلاف عمده در راه‌اندازی دو مسیر گفته شده و همچنین تفاوت در میزان گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها در درون و بیرون سلول و اینکه در جریان هیپرگلیسمی به دلیل عدم انتقال کافی گلوکز به درون‌سلول، امکان اختلال در اجزاء تشکیلات درون سلولی از جمله گیرنده PMA کمتر از بروز گلیکوزیلاسیون اجزاء بیرونی و سطحی غشا از قبیل گیرنده fmlp می‌باشد، پاسخ به محرک PMA می‌تواند متفاوت از پاسخ به محرک fmlp باشد. به نظر می‌رسد

## مآخذ

1. Le Roith D, Taylor SI, Olefsky MJ. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*, 2<sup>nd</sup> edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
2. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1999; 26(3-4): 259-65.
3. Muller F, Rollag H, Froland SS. Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages. Effect of oxidative burst stimulants and interferons. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 1989; 97: 490-6.
4. Freneck M. *Handbook of Immunochemistry*. London: Chapman & Hall; 1993.
5. Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 1992; 15: 256-60.
6. Tater D, Tepaut B, Bercovici JP, Youinou P. Polymorphonuclear cell derangements in type 1 diabetes. *Hormone and Metabolic Research* 1987; 19: 642-7.
7. Csato M, Dobozy A, Simon N. Study of phagocytic function with a quantitative nitroblue-tetrazolium (NBT) reduction test in diabetes mellitus. *Archives of Dermatological Research* 1980; 268: 283-8.
8. Balasoiu D, van Kessel KC, van Kats-Renaud HJ, Collet TJ, Hoepelman AI. Granulocyte function in women with diabetes and asymptomatic bacteriuria. *Diabetes Care* 1997; 20: 392-5.
9. Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff MC, Allannic H, Genetet B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabetic Medicine* 1997; 14: 29-34.
10. Chang FY, Shaio MF. Respiratory burst activity of monocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 1995; 29: 121-7.
11. Galenok VA, Zhuk EA. The characteristics of the peripheral blood monocytes in diabetics. *Terapevticheskii Arkhiv* 1997; 69: 59-62.
12. Kitahara M, Eyre HJ, Lynch RE, Rallison ML, Hill HR. Metabolic activity of diabetic monocytes. *Diabetes* 1980; 29: 251-6.
13. Nielson CP, Hindson DA. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. *Diabetes* 1989; 38: 1031-5.