

© Шлыкова О. А., Микитюк М. В., Боброва Н.Л., Измайлова О. В., Мамонтова Т.В., Баранова А. Ф., Веснина Л.Э., Кайдашев И. П.  
УДК 615.276–612.062

## ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА НА ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН И ХРОНИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ ПРИ ДИЕТЕ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ФРУКТОЗЫ\*

Шлыкова О. А., Микитюк М. В., Боброва Н.Л., Измайлова О. В., Мамонтова Т.В., Баранова А. Ф., Веснина Л.Э., Кайдашев И. П.  
Высшее учебное заведение Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава

*Досліджено вплив метформіну на ліпідний обмін і рівень експресії прозапальних факторів у тканинах печінки мишей, що знаходились на дієті з високим вмістом фруктози (ДВВФ) (60 г фруктози/100 г корму). Визначено концентрації загального холестерину (ЗХ), триглицеридів (ТГ), церулоплазміна (ЦП), глюкози у сироватці крові та експресію mRNA інгібітора NF-κB (IκBa), мРНК фактора некрозу пухлин α (TNFα) в гомогенатах тканин печінки 3-х місячних мишей лінії BALBc масою 25-30 г. Продемонстровано, що збільшення вмісту фруктози в раціоні харчування призводить до підвищення концентрації глюкози, ЗХ і ТГ у крові мишей. Посилюються прояви системної запальної відповіді, про що свідчить зростання рівня ЦП у сироватці крові і рівня експресії мРНК TNFα в тканинах печінки тварин, що знаходились на ДВВФ. Метформін у дозі 50 мг/кг/доб. знижував продукцію ТГ у сироватці крові мишей, що знаходились на ДВВФ, сприяв нормалізації печінкового глюконеогенезу. Введення метформіну спричиняло протизапальну дію, шляхом зниження концентрації сироваткового ЦП та експресії мРНК TNFα в тканинах печінки цих тварин. Таким чином, отримані дані свідчать про протективний ефект метформіну на ліпідний обмін, а також рівень експресії прозапальних факторів, пов'язаних з NF-κB-сигнальним шляхом у тканинах печінки мишей, які перебували на ДВВФ.*

Ключові слова: дієта з високим вмістом фруктози, метформін, експресія, прозапальні фактори.

Многочисленные исследования показывают, что диета с высоким содержанием фруктозы (ДВСФ) вызывает различные патологические изменения, в том числе окислительный стресс, нарушение толерантности к глюкозе, инсулинорезистентность, сахарный диабет 2 типа, болезни печени, артериальную гипертензию и другие сердечно-сосудистые заболевания [16]. Показано, что нарушения липидного обмена при развитии стресса гепатоцитов у животных, находящихся на ДВСФ, происходит в результате перенагрузки фруктозного метаболизма [11]. Увеличение продукции липидов в печени способствует повышению митохондриального бета-окисления жирных кислот, генерации продуктов пероксидации, которые стимулируют IκB-киназу (IKK), а следовательно и активацию NFκB [7]. Известно, что в тесной связи с активацией провоспалительных ядерных транскрипционных факторов (ЯТФ), прежде всего NFκB, находятся молекулярные механизмы развития хронического низкоинтенсивного системного воспаления (ХСВ) [5].

В последние годы была сформулирована концепция перманентной активации NF-κB (долгосрочной и низкоинтенсивной), как возможного типового патологического процесса, который обуславливает взаимосвязь инсулинорезистентности, хронического воспаления, артериальной гипертензии, эндотелиальной дисфункции и дислипидемии (Кайдашев И.П., 2012). В связи с этим, актуальным является поиск методов снижения транскрипционной активности NF-κB (диета, физические нагрузки, лечебные препараты), которые будут устранять молекулярную основу раз-

вития метаболического/инсулинорезистентного синдрома и снижать риск сердечно-сосудистых заболеваний [2]. В ранее проведенных исследованиях было показано, что метформин снижает активацию NFκB, возможно, за счет ингибирования активации IKK [1].

Цель работы: исследование влияния метформина на уровень глюкозы, липидный обмен и уровень экспрессии провоспалительных факторов в тканях печени мышей, которые находились на диете с высоким содержанием фруктозы.

### Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на 3-х месячных мышах линии BALBc массой 25-30г, которых содержали в полипропиленовых клетках в контролируемых условиях 12 часового светового/12 часового темного цикла. Животные находились на стандартном рационе питания (60% растительного крахмала) и воде в неограниченном доступе одну неделю. Исследование проведено в соответствии с разрешением комиссии по биоэтике Высшего государственного учебного заведения Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия».

Через неделю акклиматизационного периода животные были разделены на 4 группы поровну: 1 группа – мыши, находящиеся на стандартном рационе питания и воде; 2 группа – мыши, находящиеся на стандартном рационе питания и воде, которым вводили метформин (per os) в дозе 50 мг/кг с 85-ого дня эксперимента в течении 49 дней [14,15]; 3 группа – мыши, которые находились на ДВСФ (60г фрукто-

\* Цитування при атестації кадрів: Шлыкова О. А., Микитюк М. В., Боброва Н.Л., и др. Влияние метформина на липидный обмен и хроническое воспаление в тканях печени мышей при диете с высоким содержанием фруктозы // Проблеми екології і медицини. – 2014. – Т. 18, № 3-4. – С. 64–67.

зы/100г корма); 4 группа – мыши, находящиеся на ДВСФ, которым вводили метформин (per os) в дозе 50 мг/кг с 85-ого дня эксперимента в течении 49 дней.

В состав стандартного рациона питания входила зерновая смесь (пшеница, овес, ячмень, просо), кукуруза, семена подсолнечника, горох, зерновой гранулят, орехи, сухие фрукты. Минеральные компоненты: соли кальция, фосфора, калия, натрия. Витамины: А, В1, В2, Д3, Е, Н. Содержание питательных веществ: сырой протеин – 11%, сырой жир – 4,0%, сырая клетчатка – 10,0%, кальций – 0,15%, фосфор – 0,1%, влага – 10%.

На 134 день эксперимента после 12-часового периода голодания животным проводили определение концентрации глюкозы в сыворотке крови до и через 120 минут после нагрузки глюкозой (2г/кг) (тест на толерантность к глюкозе). Концентрацию глюкозы (ГЛ) определяли в крови из хвостовой вены, при помощи глюкометра «ГЛЮКОФОТ» со стандартными индикаторными-полосками «ГЕМОГЛАН» (ПВП «НОРМА», Украина).

На 135 день экспериментального периода животные были умерщвлены путем цервикальной дислокации. Кровь отбирали в сухие пластиковые пробирки. Сыворотку отделяли центрифугированием при 400g 10 минут. В сыворотке крови определяли концентрацию общего холестерина (ОХ) и триглицеридов (ТГ) с помощью наборов реагентов (LASCHEMA, Чехия), концентрацию церулоплазмينا (ЦП) методом ферментативного окисления п-фенилдиамина [3]. Проводили забор тканей печени на льду и гомогенизировали ее в охлажденном 0,1М фосфатном буфере, pH 7,4. В гомогенате печени определяли содержание матричной РНК (mRNA) ингибитора NF-kB (IкBa) и mRNA фактора некроза опухоли α (TNFα), выделенную при помощи комплекта реагентов «Рибозоль-В» (AmpliSens, Россия). Для получения кДНК в реакции обратной транскрипции использовали праймер олиго (dT) 18 и обратную транскриптазу M-MuLV (SibEnzyme, Россия). Анализировали экспрессию генов методом ПЦР в режиме «реального времени», применяя олигонуклеотидные праймеры к кДНК IкBa: 5'-TGAAGGACGAGGAGTACGAGC-3'; 5'-TTCGTGGATGATTGCCAAGTG-3' и TNFα: 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3'; 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3', в присутствии красителя SYBR Green I («Синтол», Россия) с использованием детектирующего амплификатора ДТ-322 («ДНК-Технология», Россия) путем относительного количественного анализа. В качестве референтного гена использовали ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH): 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'; 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3'.

Для анализа данных применяли относительный Ct метод с расчетом ΔCt [18].

Результаты обработаны статистически при помощи программы STATISTICA 6.0. ("StatSoft", США). Данные приведены в виде выборочного среднего (M), выборочного стандартного отклонения (S/D). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

**Результаты и их обсуждение**

Как показали наши исследования в течении экспериментального периода наблюдалось постепенное увеличение массы тела в исследуемых группах мышей. В таблице 1 показано, что окончательная сред-

няя масса тела мышей (г) составляла в 1 группе – 32,9±2,0; во 2, 3 и 4: 34,7±2,33; 29,9±5,29; 31,1±2,08, соответственно. Следует отметить, что средние значения окончательной массы тела мышей существенно не отличались друг от друга по группам.

Таблица 1. Изменение массы тела в исследуемых группах животных (M ±SD).

Показатель	Группы			
	1	2	3	4
Исходная масса тела, г	28,4±2,2	31,2±1,56	25,9±2,1	29,2±1,13
Масса тела ч/з 84 дня, г	32,6±2,8	33,7±0,77	28,8±3,2	30,3±1,36
Масса тела ч/з 134 дня, г	32,9±2,0	34,7±2,33	29,9±5,29	31,1±2,08

При определении толерантности к глюкозе, в исследуемых группах мышей было отмечено статистически значимое возрастание концентрации ГЛ натощак в крови мышей находящихся на ДВСФ, в отличие от мышей 1 группы (p=0,0059) (рис.1). Под влиянием метформина концентрация глюкозы в сыворотке крови мышей 4 группы снижалась в сравнении с 3 группой мышей (p=0,052) (рис.1)

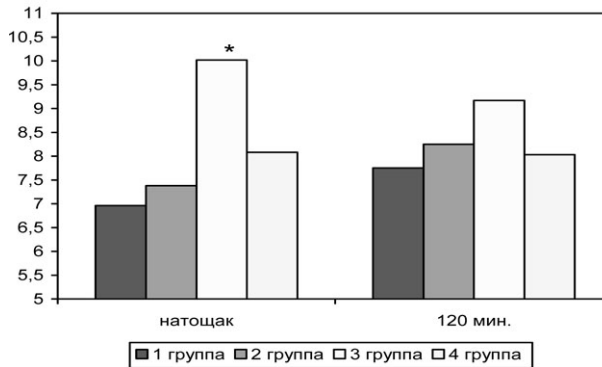


Рисунок 1. Уровень глюкозы в группах исследуемых животных натощак и через 120 минут после нагрузки глюкозой (2г/кг).

Примечание: \* – p<0,05 по сравнению с 1 группой.

В наших исследованиях под воздействием ДВСФ изменялись процессы липогенеза в клетках печени, о чем свидетельствовало повышение уровня ОХ до 3,05±0,57 ммоль/л и ТГ до 2,15±0,42 ммоль/л в сыворотке крови 3 группы мышей по сравнению с мышами 1 группы, которые находились на стандартном рационе питания без добавления фруктозы (p<0,05) (табл.2).

Таблица 2. Изменения уровня общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови исследуемых животных (M ±SD).

Показатель	Группы			
	1	2	3	4
ОХ, ммоль/л	1,6 ± 0,38	1,75 ± 0,31	3,05 ± 0,57*	2,6 ± 0,46
ТГ, ммоль/л	1,13 ± 0,57	1,3 ± 0,35	2,15 ± 0,42*	1,48 ± 0,23**

Примечание: \* – p<0,05 по сравнению с 1 группой; \*\* – p<0,05 по сравнению с 3 группой.

Метформин снижал интенсивность липогенеза в клетках печени 4 группы мышей, о чем свидетельствовало уменьшение уровня ТГ (1,48±0,23 ммоль/л) по сравнению с 3 группой (2,15±0,23 ммоль/л) (p=0,049), уровень ОХ статистически значимо не изменялся (p=0,2) (табл.2).

В тоже время по данным гистологических исследований не наблюдалось клинически значимых структурных изменений тканей печени ни у одной из групп мышей. Также не изменялись показатели коэффициента массы печени в исследуемых группах животных, которые составили для 1 группы -  $0,056 \pm 0,008$ , 2 группы -  $0,054 \pm 0,003$ , 3 группы -  $0,06 \pm 0,009$ , 4 группы -  $0,061 \pm 0,01$ .

На следующем этапе работы оценивали проявления системного воспалительного ответа. В качестве маркеров воспалительного процесса определяли уровень ЦП в сыворотке крови и экспрессию мРНК TNF $\alpha$  и IкВ $\alpha$  в гомогенатах тканей печени. В предыдущих исследованиях Кайдашев И. П. и соавт., 2008, было предположено, что содержание ЦП в сыворотке крови может служить маркером повышенного риска воспаления при метаболическом синдроме, и наряду с другими показателями, позволит оценить уровень развития системного воспалительного ответа [4]. Как видно из данных, представленных на рисунке 2, увеличение содержания фруктозы в рационе питания привело к достоверному увеличению уровня церулоплазмينا в сыворотке крови 3 группы мышей  $297,65 \pm 17,07$  мг/л по сравнению с 1 группой -  $221,9 \pm 18,5$  мг/л ( $p=0,0004$ ).

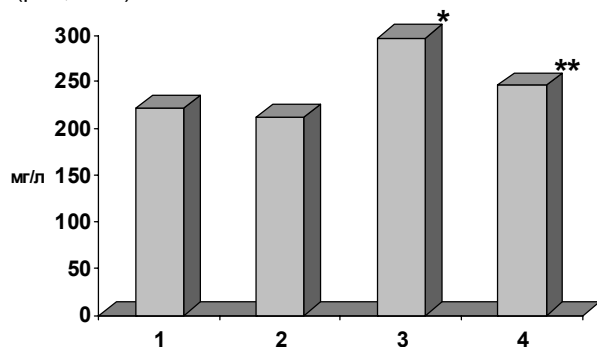


Рисунок 2. Изменения уровня церулоплазмينا в группах исследуемых животных.

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с 1 группой;  
\*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с 3 группой.

Была изучена экспрессия мРНК TNF $\alpha$  и IкВ $\alpha$  в тканях печени мышей при увеличении содержания фруктозы в рационе питания и при воздействии метформина.

В группе животных, находящихся на ДВСФ усиливалась экспрессия мРНК TNF $\alpha$  и практически не изменялась экспрессия мРНК IкВ $\alpha$  (табл.3).

Под воздействием метформина уменьшались проявления хронического воспаления за счет снижения уровня церулоплазмينا в сыворотке крови животных 4 группы ( $246,67 \pm 15,41$  мг/л) в сравнении с 3 группой ( $297,65 \pm 17,07$  мг/л) ( $p=0,0044$ ) (рис.2). Под влиянием метформина снижался уровень экспрессии мРНК TNF $\alpha$  в клетках печени, исследуемых животных. Метформин практически не влиял на экспрессию мРНК IкВ $\alpha$  (табл.3).

В нашем исследовании продемонстрировано, что увеличение содержания фруктозы в рационе питания приводит к повышению концентрации глюкозы, ОХ и ТГ в крови мышей. Усиливаются проявления системного воспалительного ответа, о чем свидетельствует повышение уровня церулоплазмينا в сыворотке крови и уровня экспрессии мРНК TNF $\alpha$  в тканях печени животных находящихся на ДВСФ. В тоже время, мы не наблюдали в таях увеличения массы тела и

структурных изменений тканей печени мышей при высоком потреблении фруктозы с пищей.

Таблица 3.  
Изменения уровня относительных экспрессий мРНК TNF $\alpha$  и мРНК IкВ $\alpha$  в тканях печени исследуемых животных ( $M \pm SD$ ).

Показатель	Группы			
	1	2	3	4
Экспрессия ФНО-альфа, $\Delta Ct$	14,67 $\pm 0,74$	11,62 $\pm 0,78$	12,42 $\pm 0,94^*$	14,75 $\pm 1,04^{**}$
Экспрессия IкВ-альфа, $\Delta Ct$	11,2 $\pm 1,04$	10,0 $\pm 0,28$	10,62 $\pm 0,88$	11,2 $\pm 1,97$

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с 1 группой;  
\*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с 3 группой.

Полученные данные об изменении процесса липогенеза в клетках печени мышей на ДВСФ согласуются с исследованиями Basciano H.et all, 2005, в которых показано, что большое поступление фруктозы в печень, активирует метаболизм глюкозы и пути ее усвоения, и приводит к значительному повышению скорости de novo липогенеза, синтеза триглицеридов (ТГ), что обусловлено высоким потоком глицерина и ацил частей молекул фруктозного катаболизма. Эти метаболические нарушения, по всей видимости, могут быть одной из причин, лежащих в основе индукции резистентности к инсулину, которая часто наблюдается у людей и животных при большом потреблении фруктозы с пищей. [8].

Отсутствие увеличения массы тела мышей, изменений массы и структуры печени в наших исследованиях возможно связано с большим содержанием пищевых волокон в рационе их питания. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования показали благотворное влияние диеты с высоким содержанием пищевых волокон на течение метаболического синдрома [6, 9, 10].

Усиление системного воспалительного ответа в наших исследованиях, подтверждается повышением концентрации сывороточного церулоплазмينا и экспрессии мРНК TNF $\alpha$  в печени, а как известно TNF $\alpha$  является маркером активации NFкВ. Существуют данные, показывающие, что печеночная инсулинорезистентность индуцированная активацией NFкВ связана с повышением экспрессии TNF $\alpha$ , IL-6 и IL-1 [12].

В предыдущих наших исследованиях было выдвинуто предположение, что метформин влияет на NFкВ-сигнальный путь, возможно изменяя активность IKK [1]. Активация IKK является одним из ключевых медиаторов инсулинорезистентности, о чем свидетельствует повышение чувствительности к инсулину при направленных нарушениях в гене IKK [17] Учитывая, что в данном исследовании активация NFкВ в тканях печени мышей может быть связана с избыточной экспрессией IKK и вызывает резистентность печени, скелетных мышц к действию инсулина и признаки системной воспалительной реакции (увеличение сывороточного IL-6) [13], мы продолжили изучение влияния метформина на NFкВ-сигнальный путь в эксперименте.

В нашем исследовании, метформин в дозе 50 мг/кг снижал продукцию триглицеридов в клетках печени мышей находящихся на ДВСФ, способствовал нормализации печеночного глюконеогенеза. Введение метформина оказывало противовоспалительное действие, путем снижения концентрации сывороточ-

ного церулоплазмину и экспрессии мРНК TNF $\alpha$  в тканях печени этих животных.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о протективном эффекте метформина на углеводный, липидный обмен, а также уровень экспрессии провоспалительных факторов, связанных с NF $\kappa$ B-сигнальным путем в тканях печени мышей, которые находились на диете с высоким содержанием фруктозы.

### Литература

1. Влияние метформина на продукцию провоспалительных цитокинов и инсулинорезистентность (NF $\kappa$ B-сигнальный путь) / Лавренко А. В. [и др.] // Проблемы эндокринологии. - 2012. - №2. - С. 25 – 28
2. Кайдашев І.П. Активация NF- $\kappa$ B при метаболічному синдромі / І. П. Кайдашев // Фізіол. Журн. -2012. – Т.58, №1. – С. 93-101
3. Колб В. Г., Калашников В. С. Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1976. – С. 219 – 220
4. Куценко Л. А. Место церулоплазмину среди белков острой фазы как маркера системного воспаления / Л. А. Куценко, И. П. Кайдашев // Лабораторна діагностика. – 2011. – 3(57). – С. 59 – 68
5. Лавренко А. В. 4Метформин и пиоглитазон как средства борьбы с системным воспалением низкой интенсивности / А. В. Лавренко, Н. И. Винник, С. М. Расин, М. С. Расин, И. П. Кайдашев // Проблемы екології та медицини. – 2012. – Т. 16., №3-4. – С. 3 – 8.
6. Activation 15 of the AMP activated protein kinase by short-chain fatty acids is the main mechanism underlying the beneficial effect of a high fiber diet on the metabolic syndrome / Hu GX, Chen GR, Xu H, Ge RS, Lin J. // Med Hypotheses. -2010. – Vol.74(1). – P. 123-126.
7. Arkan M. C. 3Hevener AL, Greten FR, et al. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance / M. C. Arkan, A. L. Hevener, F. R. Greten [et all.] // Nat.Med. – 2005. – N 11. – P. 191-198.

8. Basciano H. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia [Електронний ресурс] / H. Basciano, L. Federico, A. Khosrow // Nutrition & Metabolism. – 2005. - 2:5. – Режим доступу до журн.: doi:10.1186/1743-7075-2-5.
9. Ferguson L. R. Is the dietary fibre concept becoming too hard to digest? / L. R. Ferguson // British Journal of Nutrition. – 2008. - N 100. – P. 693–694
10. Health benefits of dietary fiber / James W Anderson, Pat Baird, Richard H Davis [et all.] // Nutrition Reviews®. - Vol. 67(4). – P. 188–205.
11. Kelley G. L. High dietary fructose induced a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation / G. L. Kelley, G. Allan, S. Azhar // Endocrinology. - 2004. - N 145. – P. 548 – 555.
12. Lazar M. A. 16 The tumoral side of insulin resistance / M. A. Lazar // Nat Med. – 2006. – N.12. – P.43 –44.
13. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB / D. Cai, M. Yuan, D. F. Frantz [et all.] // Nat Med. - 2005. – Vol. 11. – P. 183–190
14. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state / M. Foretz [et all.] // The Journal of Clinical Investigation. – Vol.120, N.7. - P. 2355 – 2369.
15. Metformin therapy in a hyperandrogenic anovulatory mutant murine model with polycystic ovarian syndrome characteristics improves oocyte maturity during superovulation / Sabatini M. E. Et al // Journal of Ovarian Research. – 2011. Vol. – 4. – P. 8.
16. Poss 1A. P. A high fructose diet impairs spatial memory in male rats / A. P. Poss [et all.] // Neurobiol Learn Mem. - 2009. - Vol. 92, N. 3. – P. 410 – 416.
17. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta / Yuan M., Konstantopoulos N., Lee J. [et all.] // Science. – 2001. – Vol. 293(5535). – P. 1673–1677
18. Schmittgen T. D., Livak K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C<sub>t</sub> method / T. D. Schmittgen, K. J. Livak // NATURE PROTOCOLS. – 2008. - Vol.3, N.6. – P. 1101 – 1108.

## **ENGLISH VERSION: INFLUENCE OF METFORMIN ON LIPID METABOLISM AND CHRONIC INFLAMMATION IN THE LIVER TISSUES OF MICE ON A DIET RICH IN FRUCTOSE\***

Shlykova O.A., Mikityuk M.V., Bobrova N.L., Izmailova O.V., Mamontova T.V., Baranova A.F., Vesnina L.E., Kaidashev I.P.  
Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava

*The effect of metformin on lipid metabolism and the expression of pro-inflammatory factors in the liver tissue of mice that were on a diet rich in fructose (DRF) (60 g fructose / 100 g of food) has been studied. The concentrations of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), ceruloplasmin (CP), glucose in serum and mRNA expression of inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ), mRNA of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) have been determined in homogenates of liver tissues in 3-months-aged mice of BALBc line weighing 25-30 g. It has been demonstrated that increasing the content of fructose in the diet leads to increased concentrations of glucose, TC and TG in the blood of mice. Manifestations of systemic inflammatory response become stronger, as evidenced by the increase in CP in the blood serum and the expression level of mRNA of TNF $\alpha$  in liver tissues of animals that were on a DRF. Metformin in the dose of 50 mg / kg per day reduced the production of triglycerides in the blood serum of mice that were on a DRF; it contributed to the normalization of hepatic gluconeogenesis. Administering metformin caused anti-inflammatory effect by lowering serum CP and expression of mRNA of TNF $\alpha$  in liver tissues of these animals. Thus, the data suggest the protective effect of metformin on lipid metabolism and the expression of pro-inflammatory factors associated with NF- $\kappa$ B-signaling pathway in the liver tissues of mice which were on a DRF.*

Keywords: diet rich in fructose, metformin, expression, proinflammatory factors.

Numerous studies display that diet rich in fructose (DRF) causes various pathological changes, including

oxidative stress, impaired glucose tolerance, insulin resistance, type 2 diabetes, liver conditions, hypertension

\* To cite this Shlykova O.A., Mikityuk M.V., Bobrova N.L., et al. Influence of metformin on lipid metabolism and chronic inflammation in the liver tissues of mice on a diet rich in fructose // Problemy ekologії ta medytsyny. - 2014. - Vol 18, № 3-4. - P. 67 -70.