

心血管疾病与骨质疏松

孙宇 崔燎

摘要：心血管疾病与骨质疏松症是老年人的常见病和多发病。近年来研究发现两者有相似的治疗和发病机制。笔者从基础研究、临床试验结果等方面，对近年来有关心血管疾病与骨质疏松症之间的关系最新进展作一简单综述。

关键词：心血管疾病；骨质疏松；雌激素

Research development of cardiovascular disease and osteoporosis SUN Yu, CUI Liao. 1. Departement of Pharmacology; 2. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs; Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China

Abstract: Cardiovascular diseases and osteoporosis are common senile diseases. Recently, research has found that they have some association in cure drug and pathogenesis. This article reviews the development about study and clinical trial of relationship between cardiovascular diseases and osteoporosis.

Key words: Cardiovascular disease; Osteoporosis; Estrogen

心血管疾病(Cardiovascular disease, CVD)与骨质疏松症(osteoporosis, OP)是老年人的常见病和多发病,严重影响老年人的生活质量和生存率。CVD 主要包括风湿热、慢性风湿性心脏病、高血压病、缺血性心脏病、肺心病、脑血管疾病、动脉粥样硬化、栓塞等。流行病学显示心血管疾病与骨质疏松有密切相关性, Farhat GN^[1]观察 3075 例健康人(42% 黑种人, 51% 女性)骨密度与 CVD 的关系,发现低骨密度组 CVD(确诊为冠心病、PAD、脑血管疾病与充血性心衰)发病率为 29.8%。男性骨矿密度(vBMD)与 CVD 负相关,女性上述标准差均降低,体骨矿密度、皮质骨体骨矿密度、股骨头面骨密度(aBMD)的降低使 CVD 患病率各显著增加 28%, 27%, 22%。证实了 CVD 与骨密度(BMD)降低有相关性。CVD 与 OP 有相关性,心血管疾病与骨质疏松症有相似的或共同的病理学机制和危险因子。心血管和骨共有的基质蛋白如胶原蛋白-1,黏蛋白,骨桥蛋白与骨结合素影响骨形成和动脉粥样硬化(AS)形成。雌激素缺乏导致细胞因子如 IL-1, IL-6, 肿瘤坏死因子 TNF- α 增加与 OPG 降低,进而影响骨丢失与 AS

形成。心血管疾病的危险因素,绝经、老年、血脂异常、氧化应激、炎症、高胱氨酸血症、高血压、糖尿病与低骨密度(LBMD)相关联^[2]。一些研究提示二磷酸盐、他汀类药物与雷洛昔芬等对 AS 斑块及骨细胞水平上的作用机制相似。有希望研发出可以同时治疗 CVD 与 OP 的药物。笔者从基础研究、临床试验结果等综述近年来有关心血管疾病与骨质疏松关系的最新进展。

1 高血压与骨质疏松

高血压是由总周围血管阻力增加或是心排血量增加或两者兼有引发的。钠-钾泵($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶)的抑制或缺陷或由于对钠的通透性增高使肾上腺素的作用得到增强,交感神经系统的刺激,肾素-血管紧张素-醛固酮系统异常,血管扩张物质的缺乏均会引发高血压。

高血压与骨质疏松有相关性,临床发现原发性肺动脉高血压患者 63% 有股骨颈 BMD 降低, 72% 有脊椎腰段 BMD 降低^[3],高血压危险因素 HDL 水平与 BMD 有关联,酒精与椎骨高 BMD 有关联^[4]。

高血压与 OP 相关联的机理有如下几方面:肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)参与血压调节,其调节因子血管紧张素 I 与 II 同时是调节破骨细胞骨吸收的因素之一^[5],骨组织中可能存在 RAAS 系统调节骨吸收。血管紧张素 II 可调节骨重建中毛细

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672470)

作者单位:524023 湛江 广东医学院药理教研室(孙宇);广东天然药物研究与开发重点实验室(崔燎)

通讯作者:崔燎, Email: cuiliao@163.com

血管增殖与成骨细胞的骨形成,刺激新生鼠头盖骨成骨细胞增殖。原发性高血压大鼠血管紧张素 II 水平升高易出现股骨 BMD 降低,骨血管痉挛与硬化,股骨头坏死,骨细胞凋亡并显示高骨转换率,破骨细胞活性增加,成骨细胞减少,骨量降低^[6,7]。

研究已发现常用的抗高血压药物 RAAS 抑制剂卡托普利对小鼠具有增加骨量的作用^[8]。抗高血压药物钙拮抗剂通过减少细胞内钙浓度来影响心血管功能,同时影响成骨细胞与破骨细胞的功能,对骨代谢有正面和负面影响。钙拮抗剂可抑制体外破骨细胞 L 型电压依从性钙通道,使骨陷窝减少,骨吸收减少,细胞内钙增加^[9]。1,25-羟化醇通过钙介导的 cAMP 途径调节成骨细胞功能。IGF-I、表皮生长因子、内皮素-1 与 OPG 均通过激活 L 型-钙通道调节成骨细胞增殖与分化。血管扩张物质 NO 可调节血管平滑肌功能,同时增加去卵巢大鼠骨髓基质细胞 OPG 的分泌,抑制破骨细胞的生成^[10]。

2 冠状动脉疾病(CAD)与骨质疏松

动脉粥样硬化以中等和大动脉斑片状内膜下增厚为特征可以减少或阻断血流。大多数 CAD 是由于营养心脏的大、中动脉内膜下粥样斑块的沉积所致。一项前瞻性研究提示二尖瓣环钙化(MAC)与女性尤其是绝经后妇女 OP 有相关性。观察 340 名平均年龄 56 岁,±10 岁的妇女,正常组(123 人)与 MAC 组(217 人)骨质疏松发病率(18.2%, 55.5%, $P < 0.001$)差异有显著性^[11]。研究发现冠心病对骨质疏松有最高预警作用(优势比 5.6, 95% 置信区间 2.6~12.0, $P < 0.0001$)^[12]。证实 OP 与 CAD 密切相关。

CAD 与 OP 有关联的机理可能是:骨质疏松时作用于破骨细胞并使破骨细胞向成骨细胞转化减少的 PTH 逐渐上升,导致骨溶解增加,使骨钙动员入血,体循环中的钙可沉积在动脉壁内膜中,造成血管壁粥样硬化、钙化^[13,14]。冠心病合并 OP 患者心脏收缩及舒张功能较非 OP 组差且心律失常发生率也高的机理可能是体内钙镁等矿物质含量降低^[15,16],缺镁使镁抑制的血小板聚集增加加剧血栓形成,已发现缺镁饮食加速动脉硬化^[17]。有报道指出缺镁普遍合并 OP,缺镁引起低钙血症,PTH 分泌损伤以及终末器官对 PTH 作用的阻抗,血清 1,25(OH)₂D₃ 水平降低。这两种激素降低易导致骨质疏松发生^[18]。

3 中风与骨质疏松

脑出血、蛛网膜下腔出血、脑梗塞、脑血栓、短暂性脑缺血发作等急性脑血管疾病统称为中风。其病因是在各种诱因如情绪激动、精神紧张、用力过猛、血压升高等影响下,脑血管壁粥样硬化致使的血管腔变狭窄或夹层动脉瘤易造成血管破裂或堵塞,使脑血液循环障碍,形成部分脑组织缺血、水肿等病理改变,导致神经功能障碍,从而相应出现一系列的中风病症状。

中风与 OP 有相关性。中风患者偏瘫侧 BMD 与骨量明显降低^[19],髋关节股骨骨折发病率增加。早期中风患者是偏瘫侧废用引发骨吸收增加导致骨质减少^[20],长期中风患者是偏瘫程度,1,25-羟化醇缺乏与代偿性甲状腺功能亢进不足导致骨质减少。中风患者血清甲状旁腺激素、降钙素、酸性磷酸酶含量高于正常组,血清 1,25-羟化醇含量低于正常组且与中风患者偏瘫侧骨量降低负相关。中风患者血清甲状旁腺激素显著提高 17% 且与降钙素水平正相关^[21]。OP 女性更容易发生中风和类似充血性心脏衰竭和胸部疼痛这样的 CVD,其机理可能是破骨细胞促使钙质在动脉沉积,形成血栓。颈动脉粥样斑块与低骨量有联系,前者是缺血性中风的主要危险因素^[22]。

应用骨吸收抑制剂二膦酸盐可以增加中风老年男性与急性中风老年女性骨密度,减少髋骨骨折发生率^[23,24]。雷洛昔芬不但能对未发生骨质疏松症的绝经后的妇女起到很好的预防作用,而且还可有效提高骨质量和 BMD,预防 OP 性骨折的发生,从而有效地治疗绝经后 OP。但雷洛昔芬导致中风风险升高,对于有中风史或者存在其他中风危险因素绝经后妇女,应该权衡使用雷洛昔芬的风险与效益^[25]。

4 高脂血症与骨质疏松

高脂血症是由于脂肪代谢或转移异常使血浆中一种或几种脂质高于正常水平,可表现为高胆固醇血症、高甘油三脂血症或两者兼有(混合型高脂血症)。

高脂血症与骨质疏松有相关性表现在低骨量或骨质疏松患者常常伴有高血脂^[26],绝经期后妇女血脂比例与血胆固醇是 OP 的危险因子^[27]。Yamaguchi^[28]调查 214 例绝经后妇女结果提示血脂水平与骨量和骨脆性密切相关。另有研究提示高血

甘油三酯与高血胆固醇受试者确实与高 BMD 及一些骨位点有相关性^[29]。

高脂血症与骨质疏松有相关性的机理可能是高脂血症患者的血管中大量存在氧化型脂蛋白,其在体外可抑制成骨细胞前体细胞系向成骨细胞的分化,使其骨钙素表达降低,体外形成钙结节减少;将高脂血症动物骨髓细胞体外诱导向成骨细胞分化并不能诱导形成成骨细胞,提示氧化型脂蛋白对成骨细胞的分化和功能有重要的影响^[30,31]。研究发现在骨质疏松大鼠的骨组织和骨质疏松患者骨组织的血管中有大量脂质沉积^[32],由于未成熟的成骨细胞常常位于骨组织血管下的内皮基质中,因此有学者推测沉积于血管内皮基质下的脂质可直接抑制未成熟成骨细胞分化为成骨细胞或可能作为异物引起骨吸收。

他汀类药物是重要的降胆固醇和降血脂的药物。研究发现他汀类药物能增加骨密度^[33]。他汀类药物抑制 HMG-CoA 还原酶,使抑制骨形态发生蛋白 BMP-2 基因的启动因素甲羟戊酸减少,增加骨形态发生蛋白 BMP-2 的基因表达发挥促成骨作用,同时降低骨折危险^[34]。此外,他汀类药物通过保护血管内皮细胞,降低血管阻力,增加血流量,改善脑血管供血状态来防治心脑血管事件并降低心肌梗死和脑卒中发生率。

5 雌激素与骨质疏松症和心血管疾病

观察证实绝经后妇女多并发 CVD 与 OP^[35],提示雌激素与骨质疏松症和心血管疾病密切相关。

雌激素与心血管疾病和骨质疏松相关的机制在于绝经后妇女雌激素水平下降,易引发胰岛素分泌增加而清除率下降所致的高胰岛素血症,进而降低 HDL₂ 水平并增加心血管疾病发病率。研究发现脂蛋白 α(Lp(a)) 的升高与胰岛素的分泌有关^[36],绝经后妇女易发高胆固醇血症^[38],导致内皮细胞功能障碍。胰岛素可刺激儿茶酚胺释放增加、肾脏对钠离子的重吸收增加,致使交感神经活性增加引起血压升高。雌孕激素水平生理性下降,对成骨细胞膜上雌激素受体作用降低,降低骨对甲状旁腺素及 VitD₃ 敏感性,同时雌孕激素缺乏引起的代谢异常和血管壁的改变导致体内钙丢失,引起体内血清脂蛋白(a)升高及高密度脂蛋白下降,促使动脉硬化,使血小板聚集功能增强,加速冠状动脉狭窄的形成从而引发 OP。

应用雌激素能抑制骨吸收,减少骨量丢失,增加

脊柱骨密度达 2%~4%,使心血管疾病及脑卒中的发生率降低 50%。雌激素可改善血脂代谢,升高 HDL-c,降低 LDL、总胆固醇、甘油三酯、VLDL、载脂蛋白 Lp(a) 水平(10%~15%),增加冠状动脉的保护因子载脂蛋白-AI 水平等。雌激素可影响血管活性因子如降低血管收缩因子内皮素水平,增加血管舒张因子 NO 局部水平,降低冠心病的独立危险因素血浆同型半胱氨酸水平。但美国国家卫生研究院 WHI^[37,38]研究显示,HRT 组患者虽然双髋部和椎体骨折危险性降低了 1/3,但冠心病、脑卒中危险均有增加。对于有血栓病史的妇女慎用或避免使用激素治疗。具有冠心病高危因素的患者不主张应用激素。

雌激素类药物雷洛昔芬可以显著增进低密度脂蛋白胆固醇、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 B、载脂蛋白 A-I、纤维蛋白原,增进胆固醇与 β-脂蛋白的密度,降低绝经后高甘油三酯血症妇女的脂质与脂蛋白从而降低心血管疾病危险^[39,40]。阿伐他汀治疗高胆固醇血症,减少骨折风险。阿伐他汀合并二磷酸盐有累加效应,可以改善绝经后高胆固醇血症妇女骨质疏松导致的骨质减少,恢复脊椎腰段骨密度(1.58% versus 0.75%, $P < 0.05$),对低密度脂蛋白与总胆固醇有益影响,对空腹血糖及血红蛋白水平无影响^[41]。植物雌激素类药物丹参、大豆异黄酮对 CVD 与 OP 的防治有作用^[42-44]。

6 HIV 以及抗 HIV 药物与 OP 与 CVD 的关系

研究发现 HIV 感染者的全身骨量或 BMD 比一般人低,HIV 的 OP 危险因子包括蛋白分解酶抑制剂(protease inhibitors,PI) 感染 HIV 时间的长短、HIV 病毒量、高乳酸血症、重碳酸盐浓度太低、碱性磷酸酶的浓度增加,及接受抗病毒药物之前的体重不足等^[45,46]。许多抗 HIV 新药副作用,包括高脂血症、高胰岛素血症或增加胰岛素抗性、高乳酸血症、脂肪分布异位、骨骼异常、OP、骨骼坏死包括血管坏死所导致的股骨问题及腰椎骨压迫性骨折等。应重视 HIV 以及抗 HIV 药物对 OP 与 CVD 发病率的影响,以减少抗 HIV 药物副作用的发生。

以上研究结果表明 CVD 与 OP 的发生有密切相关性,需要进一步研究以明确 CVD 与 OP 的关联,了解相同或相似的危险因子与遗传的分子决定因素之间复杂的相互作用。为研制同时治疗心血管疾病与骨质疏松的药物提供实验依据。

【 参 考 文 献 】

- [1] Farhat GN , Strotmeyer ES , Newman AB. Volumetric and areal bone mineral density measures are associated with cardiovascular disease in older men and women : the health , aging , and body composition study. *Calcif Tissue Int* ,2006 ,79(2) :102-111.
- [2] Adachey , Shitae , Matswatat , et al. Osteoporosis aftergastrectomy : bone mineral tensity of lumbar spine assessed by dual-energy x-ray absorptiometry. *Calcify Tissue Int* 2000 ,66(2) :119-120.
- [3] Tschopp O , Schmid C , Speich R , et al. Pretransplantation bone disease in patients with primary pulmonary hypertension. *Chest* , 2006 ,129(4) :1002-1008.
- [4] Armstrong DJ , Lee ASH , McQuilkin M , et al. Cardiovascular disease and osteoporosis : relationship between hypertension and fracture risk. *Ann Rheum Dis* 2006 65 :413.
- [5] Hatton R , Stinpel M , Chambers TJ. Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in rats. *Endocrinol* ,1992 ,152 5-10.
- [6] Wang Tm , Hun JF ,Jee WS , et al. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Miner* ,1993 , 20 251-264.
- [7] Inoue T ,Moriya A , Goto K , et al. What is the difference of bone growth in SHR and SD rats ?*Clin Exp Pharmacol Physiol suppl* ,1995 , S 242-243.
- [8] 陈方 ,吴铁 ,崔燎.卡托普利抗小鼠维甲酸性骨质疏松的作用探讨. *中国药理学通报* 2002 ,18 572-575.
- [9] Ritchie CK , Maercklein PB , Fitzpatrick LA. Direct effect of calcium channel antagonists on osteoclast function :alterations in bone resorption and intracellular calcium concentrations. *Endocrinology* , 1994 ,135 996-1003.
- [10] Wang FS , Wang CJ , Chen YJ , et al. Nitric Oxide Donor Increases Osteoprotegerin Production and Osteoclastogenesis-Inhibitory Activity in Bone Marrow Stromal Cells from Ovariectomized Rats. *Endocrinology* ,2004 , 145 :2148-2156.
- [11] Marcovitz PA , Tran HH , Franklin BA , et al. Usefulness of bone mineral density to predict significant coronary artery disease. *Am J Cardiol* ,2005 96(8) :1059-1063.
- [12] Larothe M. Arteriosclerosis and osteoporosis. *Presse Med* ,1996 ,25 (2) 52-54.
- [13] Laroche M , Pouilles JM , Ribot C , et al. Comparison of the bone mineral content of the lower limbs in men with ischaemic arteriosclerotic disease. *Clin Rheumatol* ,1994 23(4) 611-614.
- [14] Abbottol ,Nadler J ,Rude RK. Magnesium deficiency in alcoholics : possible contribution to osteoporosis and cardiovascular disease in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* ,1994 ,16 :1076-1082.
- [15] Barger Lux MJ ,Hearey RP. The role of calcium intake in preventing bone fragility ,hypertension and certain cancers. *Nutr* ,1994 ,124 : 14063-14123.
- [16] Wang TM , Hsu JF , Jee WSS , et al. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Mineral* , 1993 20 251-264.
- [17] Megnien JL , Simon A , Gariepy J. Preclinical changes of extracoronary arterial structures as indicators of coronary atherosclerosis in men. *Hypertens* ,1998 ,16 : 157-163.
- [18] Rude. RK1 Chronic dietary2induced magnesium deficiency alters bone and mineral homeostasis in the rat. *Magnes Res* ,1999 ,12 :2572-2671.
- [19] Sato Y , Maruoka H , Honda Y , et al. Development of osteopenia in the hemiplegic finger in patients with stroke. *Eur Neurol* ,1996 , 36 (5) 278-283.
- [20] Sato Y , Kuno H , Kaji M , et al. Increased bone resorption during the first year after stroke. *Stroke* ,1998 29(7) :1373-1377.
- [21] Oizumi K. Fujimatsu Y. Role of the parathyroid gland on bone mass and metabolism in immobilized stroke patients. *Kurume Med J* , 1998 45(3) 265-270.
- [22] Sato Y , Iwamoto J , Kanoko T , et al. Risedron ate sodium therapy for prevention of hip fracture in men 65 years or older after stroke. *Arch Intern Med* 2005 , 165(15) :1743-1748.
- [23] Sato Y , Iwamoto J , Kanoko T , et al. Risedronate therapy for prevention of hip fracture after stroke in elderly women. *Neurology* , 2005 ,64(5) 811-816.
- [24] Barrett-Connor E , Mosca L , Collins P. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2006 355(2) :125-137.
- [25] Pinals RS , Jabbs JM. Type-IV hyperlipo proteinaemia and transient osteoporosis . *Lancet* ,1972 2(7783) 929.
- [26] Brownbill RA , Ilich JZ. Lipid profile and bone paradox : higher serum lipids are associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. *Womens Health (Larchmt)* ,2006 Apr ,15 (3) 261-270.
- [27] Yamaguehi T , Sugimoto T , Yano S , et al. Plasma lipids and Osteoporosisin postmenopausalwomen. *Endocr J* ,2002 ,49(2) :211-217.
- [28] Masse PG ,Tranchant CC ,Dasy J ,et al. Coexistence of osteoporosis and cardiovascular disease risk factors in apparently healthy , untreated postmenopausal women. *Int J Vitam Nutr Res* 2005 75(2) : 97-106.
- [29] Parhami F ,Jackson SM , Le V , et al. Atherogenicdietandminimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteonic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *Bone Min Res* , 1999 ,14(12) 2067-2078.
- [30] Parhami F ,Morrow AD ,Balucan J ,et al. Lipid oxidation products have opposite effects on calcial rag vascular cell and bone cell differentiation. . A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterio Thromb Vase Biol* , 1997 ,17(4) 680-687.
- [31] Parhemi F ,Garfinkel A ,Demer L ,et al. Role of lipids in osteoporosis Arteriosclerosis ,Thrombosis ,and Vascular Biology. *Journal of the American Heart Association* 2000 20(11) 2346-2348.
- [32] Jadhav SB , Jain GK. Statins and osteoporosis : new role for old drugs. *Pharm Pharmacol* ,2006 58(1) 3-18.

- [33] Edwards CJ ,Hart DJ ,Spector TD. Oral Stains and increased bone mineral density in postmenopausal women. *Lancet* , 2000 , 355 (9222) 2218-2219.
- [34] Jedrzejuk D , Milewicz A. Consequences of menopause in women with diabetes mellitus-a clinical problem. *Gynecol Endocrinol* , 2005 , 21 (5) 280-286.
- [35] Castro Cabezas M ,Bruin TWA ,de Walk HW ,et al. Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia :A mechanism associating apolipoprotein B overproduction and insulin resistance. *Chin Invest* ,1993 ,92 :160-168.
- [36] Sidhu M ,Crook D ,Godsland I ,et al. Inverse relationship between serum Lp(a)levela and first-phase insulin secretion. *Diabetes* ,1992 , 41 :1341-1345.
- [37] Keller KB ,Lemberg L. Estrogen plus progestin , benefits and risks : the “ Women’s Health Initiative ” trials. *American Journal of Critical Care* 2005 .
- [38] Sammartino A , Cirillo D ,Mandato VD , et al. Osteoporosis and cardiovascular disease : benefit-risk of hormone replacement therapy. *Endocrinol Invest* 2005 ,28 80-84.
- [39] Dayspring T , Qu Y , Keech C. Effects of raloxifene on lipid and lipoprotein levels in postmenopausal osteoporotic women with and without hypertriglyceridemia. *Metabolism* , 2006 , 55 (7) 972-979.
- [40] Ensrud K , Genazzani AR , Geiger MJ , et al. Effect of raloxifene on

cardiovascular adverse events in postmenopausal women with osteoporosis. *Am J Cardiol* 2006 ,97(4) 520-527.

- [41] Tanriverdi HA , Barut A , Sarikaya S. Statins have additive effects to vertebral bone mineral density in combination with risedronate in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005 ,120(1) 63-68.
- [42] 崔燎 ,邹丽宜 ,刘钰瑜. 丹参水提物和丹参素促进成骨细胞活性和防治泼尼松所致大鼠骨质疏松. *中国药理学通报* , 2004 , 20(3) 286-291.
- [43] 邹丽宜 ,吴铁 ,崔燎 ,等. 复方丹参剂对糖皮质激素性骨质疏松症大鼠的防治作用. *中国临床康复* 2005 ,11(9) 236-238.
- [44] Cooke GM. A review of the animal models used to investigate the health benefits of soy isoflavones. *AOAC Int* ,2006 ,89(4) :1215-1227.
- [45] Landonio S , Quirino T , Bonfanti P , et al. Osteopenia and osteoporosis in HIV⁺ patients , untreated or receiving HAART. *Biomed Pharmacother* 2004 ,58(9) 505-508.
- [46] Mondy K , Powderly WG , Claxton SA , et al. Alendronate , vitamin D , and calcium for the treatment of osteopenia/ osteoporosis associated with HIV infection . *Acquir Immune Defic Syndr* ,2005 ,38(4) 426-431.