

小鼠视网膜电图随生长发育的变化特点

梁厚成, 马挺, 龙潭, 张红兵

基金项目: 西安市科技局课题 (No. YF07136)

作者单位: (710002) 中国陕西省西安市第一医院眼科 西安市眼科医院

作者简介: 梁厚成, 毕业于第四军医大学, 博士, 主任医师, 西安市眼科医院院长, 研究方向: 眼科临床。

通讯作者: 龙潭, 毕业于武汉大学, 博士, 副主任医师, 西安市眼科医院白内障病区副主任, 研究方向: 白内障. longtan1@sina.com

com

收稿日期: 2015-07-10 修回日期: 2015-10-23

Changes of electroretinogram in mice with the growth and development of retina

Hou-Cheng Liang, Ting Ma, Tan Long, Hong-Bing Zhang

Foundation item: Subject of Xi'an Science and Technology Bureau (No. YF07136)

Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an Eye Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Tan Long. Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an Eye Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. longtan1@sina.com

Received: 2015-07-10 Accepted: 2015-10-23

Abstract

• **AIM:** To investigate the changes of electroretinogram in mice with the growth and development of retina.

• **METHODS:** The ERG of 50 mice (50 eyes) of KUNMING at the ages of postnatal 14d (P14), P21, P28, P35 and P56 were measured respectively. The implicit times and amplitudes of b wave of Rod-ERG, a and b waves of Max-ERG, a and b waves of Cone-ERG and O1 and O2 waves of OPs at different ages, as well as amplitude of Flick-ERG, were compared.

• **RESULTS:** The Max-ERG a-waves (the 95% CI were 15.00 ~ 18.60, 12.00 ~ 15.00, 13.20 ~ 14.40, 13.20 ~ 15.00, 13.20 ~ 15.00, respectively), OPs O1 (the 95% CI were 15.00 ~ 19.80, 13.80 ~ 18.00, 13.20 ~ 14.40, 13.80 ~ 15.60, 13.80 ~ 15.60, respectively) waves shared the implicit times at the different stages, and the Flick-ERG (the 95% CI were 0.97 ~ 3.28, 0.85 ~ 2.32, 0.91 ~ 3.49, 0.94 ~ 2.68, 0.98 ~ 3.69 μ V, respectively) shared the amplitudes also. There was no significant difference among the weeks ($P > 0.05$). The implicit times of the Cone-ERG a-waves (the

95% CI were 25.20 ~ 55.20, 27.00 ~ 40.20, 27.00 ~ 38.40, 25.20 ~ 43.80, 23.40 ~ 37.80, respectively) between P14 and P28 were distinct with statistical difference ($P < 0.05$). The implicit times of Cone-ERG b-waves (the 95% CI were 70.80 ~ 88.20, 56.40 ~ 78.60, 60.00 ~ 75.60, 60.60 ~ 87.00, 62.40 ~ 81.60ms, respectively) at P14 were statistically different from those at P21 and at P28. The implicit times and amplitudes of Rod-ERG b-waves (the 95% CI were 87.00 ~ 114.00, 53.40 ~ 73.80, 52.2 ~ 63.6, 55.20 ~ 71.40, 57.60 ~ 67.80ms, and 64.21 ~ 195.07, 133.79 ~ 355.71, 130.62 ~ 355.96, 190.92 ~ 448.97, 239.26 ~ 462.40 μ V, respectively), Max-ERG b-waves (the 95% CI were 67.20 ~ 107.40, 32.40 ~ 54.60, 31.20 ~ 36.60, 31.80 ~ 42.00, 34.20 ~ 41.40ms, and 160.64 ~ 344.48, 281.74 ~ 590.09, 284.91 ~ 716.80, 358.64 ~ 737.55, 406.98 ~ 810.55 μ V, respectively), and OPs O2 waves (the 95% CI were 49.8 ~ 69.6, 29.40 ~ 42.60, 28.80 ~ 33.60, 28.80 ~ 37.80, 31.20 ~ 37.20ms, and 5.43 ~ 24.84, 54.38 ~ 147.52, 65.55 ~ 201.60, 46.33 ~ 164.79, 49.07 ~ 148.32 μ V, respectively) at P14 were different from those at other stages, and the amplitudes of OPs O1 (the 95% CI were 11.60 ~ 21.36, 6.77 ~ 53.71, 32.96 ~ 76.42, 34.06 ~ 70.37, 35.58 ~ 63.35 μ V, respectively) and Cone-ERG b-waves (the 95% CI were 5.10 ~ 15.85, 9.61 ~ 24.88, 14.96 ~ 40.73, 14.87 ~ 28.54, 13.83 ~ 51.98 μ V, respectively) were from those at other stages also, and there were significant differences. The O1 wave of OPs had been present at P14, but the second cluster of OPs of one mouse (1/10) had not been obvious at the same time.

• **CONCLUSION:** The experiment confirms that the different waves come from different cells in retina in mice at certain degree. Due to the change of the ERG in the development of mice, so it should be considered that the different development stages will affect the results when measuring the ERG of mice.

• **KEYWORDS:** electroretinogram; mice; development

Citation: Liang HC, Ma T, Long T, *et al.* Changes of electroretinogram in mice with the growth and development of retina. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(11):1867-1870

摘要

目的: 研究小鼠视网膜电图随生长发育的变化特点。

方法: 我们分别测量 50 只昆明种小鼠在出生后第 14、21、28、35 和 56d 视网膜电图, 分析比较各时间点 Rod-ERG b 波、Max-ERG a 及 b 波、Cone-ERG 的 a 及 b 波、

OPs O1 及 O2 波幅值及峰潜时、Flick-ERG 幅值。

结果:Max-ERG a 波峰潜时(各时间点 95% 可信区间依次为 15.00 ~ 18.60、12.00 ~ 15.00、13.20 ~ 14.40、13.20 ~ 15.00、13.20 ~ 15.00ms)、OPs O1 波峰潜时(各时间点 95% 可信区间依次为 15.00 ~ 19.80、13.80 ~ 18.00、13.20 ~ 14.40、13.80 ~ 15.60、13.80 ~ 15.60ms)和 Flick-ERG 幅值(各时间点 95% 可信区间依次为 0.97 ~ 3.28、0.85 ~ 2.32、0.91 ~ 3.49、0.94 ~ 2.68、0.98 ~ 3.69 μ V)在各周龄间无统计学差异($P>0.05$);Cone-ERG a 波峰潜时(各时间点 95% 可信区间依次为 25.20 ~ 55.20、27.00 ~ 40.20、27.00 ~ 38.40、25.20 ~ 43.80、23.40 ~ 37.80ms)在出生后 14d 和 28d 间存在统计学差异($P<0.05$)、出生后 14d 与出生后 21d、28d 间 Cone-ERG b 波峰潜时(各时间点 95% 可信区间依次为 70.80 ~ 88.20、56.40 ~ 78.60、60.00 ~ 75.60、60.60 ~ 87.00、62.40 ~ 81.60ms)均有统计学差异;同时出生后第 14d 与其他时间点间 Rod-ERG b 波峰潜时(各时间点 95% 可信区间依次为 87.00 ~ 114.00、53.40 ~ 73.80、52.2 ~ 63.6、55.20 ~ 71.40、57.60 ~ 67.80ms)及幅值(各时间点 95% 可信区间依次为 64.21 ~ 195.07、133.79 ~ 355.71、130.62 ~ 355.96、190.92 ~ 448.97、239.26 ~ 462.40 μ V)、Max-ERG b 波峰潜时(各时间点 95% 可信区间依次为 67.20 ~ 107.40、32.40 ~ 54.60、31.20 ~ 36.60、31.80 ~ 42.00、34.20 ~ 41.40ms)及幅值(各时间点 95% 可信区间依次为 160.64 ~ 344.48、281.74 ~ 590.09、284.91 ~ 716.80、358.64 ~ 737.55、406.98 ~ 810.55 μ V)、OPs O2 波峰潜时(各时间点 95% 可信区间依次为 49.8 ~ 69.6、29.40 ~ 42.60、28.80 ~ 33.60、28.80 ~ 37.80、31.20 ~ 37.20ms)和波幅值(各时间点 95% 可信区间依次为 5.43 ~ 24.84、54.38 ~ 147.52、65.55 ~ 201.60、46.33 ~ 164.79、49.07 ~ 148.32 μ V)以及 OPs O1(各时间点 95% 可信区间依次为 11.60 ~ 21.36、6.77 ~ 53.71、32.96 ~ 76.42、34.06 ~ 70.37、35.58 ~ 63.35 μ V)和 Cone-ERG b 波幅值(各时间点 95% 可信区间依次为 5.10 ~ 15.85、9.61 ~ 24.88、14.96 ~ 40.73、14.87 ~ 28.54、13.83 ~ 51.98 μ V)均存在统计学差异。OPs O1 波在 P14 时即已存在,而有一只小鼠(1/10)OPs 第二波群在第 2wk 时波形不明显。

结论:本实验结果在一定程度上证实了小鼠 ERG 中各波形的起源。由于小鼠 ERG 在发育过程中的变化,在测量小鼠 ERG 时应当考虑到小鼠发育阶段对结果的影响。

关键词:视网膜电图;小鼠;生长发育

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.11.07

引用:梁厚成,马挺,龙潭,等.小鼠视网膜电图随生长发育的变化特点.国际眼科杂志 2015;15(11):1867-1870

0 引言

视网膜电图(electroretinogram, ERG)是视觉电生理检查项目中的一种,主要可用来检查视网膜功能,在各种视网膜病变的诊治及评估中有着重要的作用。对于儿童视

网膜疾病及各种遗传性视网膜疾病的诊治,ERG 亦有着重要的作用。然而儿童在出生后,视网膜并未发育成熟,随着年龄的增长,视网膜功能方可逐渐发育成熟,同时由于儿童视网膜中不同种类的细胞发育速度的不同^[1],导致儿童的 ERG 与成年人相比有着不同的特征。小鼠因其 95% 以上的基因组与人类相同,并且可快速繁殖,在出生后 2mo 内即可达到性成熟,每胎可产仔 8 只以上,故其可作为多种疾病的模型动物。本文研究小鼠在发育过程中 ERG 的变化过程,以探讨小鼠视网膜发育过程及机制,以及遗传性视网膜疾病的发生、发展及治疗措施。

1 材料和方法

1.1 材料 昆明种二级小鼠(购自第四军医大学动物中心),共 50 只(50 眼),按观察的周龄分为 5 组,每组各 10 只 10 眼。所有小鼠在自然光线下饲养,不限食水。

1.2 方法^[2]

1.2.1 实验仪器 使用国特 GT-2000NV(重庆国特医疗设备有限公司)记录 ERG。刺激器为 Ganzfeld 全野刺激器。记录电极为自制 Ag-AgCl 环状角膜电极,参考电极和接地电极分别为不锈钢自制针状电极,各电极自身阻抗均小于 10 Ω 。

1.2.2 实验方案及观察指标 所有小鼠睁眼时间均在出生后 12 ~ 13d。记录 ERG 的时间点为出生后 14d (Postnatal 14 days, P14)、21d (Postnatal 21 days, P21)、28d (Postnatal 28 days, P28)、35d (Postnatal 35 days, P35)、56d (Postnatal 56 days, P56)记录 ERG^[2]。其中 P56 小鼠记录 ERG 作为成年小鼠的数据。2h 暗适应后,使用速眠新(0.5 ~ 0.8mL/kg)进行腹腔注射麻醉,同时复方托品酰胺点检查眼 4 次,进行散瞳。在暗红光条件下放置电极。其中记录电极贴于角膜表面,并滴加生理盐水减少阻抗干扰,于左侧颊部皮下置入参考电极,同时接地电极置于尾部。电极安放好后,测试干扰在适当范围后,继续关灯暗适应 5min,依次进行杆体 ERG(Rod-ERG)、最大混合反应 ERG(Max-ERG)、振荡电位(OPs)的记录。记录条件设置为:均为单次白色闪光刺激,1min 间隔。其后在 20cd/m² 背景光下进行 10min 明适应,依次记录明适应 ERG(Cone-ERG)、30-Hz 闪烁 ERG(Flick-ERG)。Cone-ERG 为连续白光闪光刺激,共叠加 10 次,刺激频率为 2Hz;Flick-ERG 刺激光亦为白光,频率为 30Hz,叠加约 100 次,直至波形平滑为止。Rod-ERG 的刺激光强度为 1.54 $\times 10^{-2}$ (cd \cdot s)/m²;其他 ERG 刺激光强度均为 2.0(cd \cdot s)/m²。振荡电位通频带为 100 ~ 300Hz,其余各项均为 1 ~ 100Hz。Flick-ERG 自第 2 个正向波开始记录 4 个波,取其平均值作为其幅值。

统计学分析:所有数据的处理使用 SPSS 10.0 软件包进行单因素方差分析,并对两两间比较使用 Dunnett T3 分析。数据以 95% 可信区间表示, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在各周龄间 Max-ERG a 波、OPs O1 波峰潜时及 Flick-ERG 幅值均无统计学差异;除 P14 和 P28 间 Cone-ERG a 波峰潜存在统计学差异外,其他各时间点无统计学差异;

表1 小鼠 ERG 中部分参数随生长发育的变化

指标	95% 可信区间						F	P
	P14	P21	P28	P35	P56			
Rod-ERG b 波峰潜时(ms) ^{a,b,c,d}	87.00 ~ 114.00	53.40 ~ 73.80	52.2 ~ 63.6	55.20 ~ 71.40	57.60 ~ 67.80	76.204	0.000	
Rod-ERG b 波幅值(μV) ^{a,b,c,d}	64.21 ~ 195.07	133.79 ~ 355.71	130.62 ~ 355.96	190.92 ~ 448.97	239.26 ~ 462.40	10.500	0.000	
Max-ERG a 波峰潜时(ms)	15.00 ~ 18.60	12.00 ~ 15.00	13.20 ~ 14.40	13.20 ~ 15.00	13.20 ~ 15.00	16.784	0.000	
Max-ERG a 波幅值(μV) ^{b,c,d}	-177.86 ~ -87.40	-286.13 ~ -122.07	-335.45 ~ -139.40	-328.61 ~ -154.05	-353.03 ~ -189.70	7.081	0.000	
Max-ERG b 波峰潜时(ms) ^{a,b,c,d,f}	67.20 ~ 107.40	32.40 ~ 54.60	31.20 ~ 36.60	31.80 ~ 42.00	34.20 ~ 41.40	128.189	0.000	
Max-ERG b 波幅值(μV) ^{a,b,c,d}	160.64 ~ 344.48	281.74 ~ 590.09	284.91 ~ 716.80	358.64 ~ 737.55	406.98 ~ 810.55	10.139	0.000	
OPs O ₁ 波峰潜时(ms)	15.00 ~ 19.80	13.80 ~ 18.00	13.20 ~ 14.40	13.80 ~ 15.60	13.80 ~ 15.60	11.734	0.000	
OPs O ₁ 波幅值(μV) ^{a,b,c,d}	11.60 ~ 21.36	6.77 ~ 53.71	32.96 ~ 76.42	34.06 ~ 70.37	35.58 ~ 63.35	16.795	0.000	
OPs O ₂ 波峰潜时(ms) ^{a,b,c,d,e}	49.8 ~ 69.6	29.40 ~ 42.60	28.80 ~ 33.60	28.80 ~ 37.80	31.20 ~ 37.20	74.070	0.000	
OPs O ₂ 波幅值(μV) ^{a,b,c,d}	5.43 ~ 24.84	54.38 ~ 147.52	65.55 ~ 201.60	46.33 ~ 164.79	49.07 ~ 148.32	14.121	0.000	
Cone-ERG a 波峰潜时(ms) ^b	25.20 ~ 55.20	27.00 ~ 40.20	27.00 ~ 38.40	25.20 ~ 43.80	23.40 ~ 37.80	6.896	0.000	
Cone-ERG a 波幅值(μV)	-3.37 ~ 4.15	-6.75 ~ 3.82	-6.92 ~ 10.92	-14.89 ~ 1.95	-14.58 ~ 3.13	1.043	0.396	
Cone-ERG b 波峰潜时(ms) ^{a,b}	70.80 ~ 88.20	56.40 ~ 78.60	60.00 ~ 75.60	60.60 ~ 87.00	62.40 ~ 81.60	5.528	0.001	
Cone-ERG b 波幅值(μV) ^{a,b,c,d}	5.10 ~ 15.85	9.61 ~ 24.88	14.96 ~ 40.73	14.87 ~ 28.54	13.83 ~ 51.98	9.582	0.000	
Flick-ERG 波幅值(μV)	0.97 ~ 3.28	0.85 ~ 2.32	0.91 ~ 3.49	0.94 ~ 2.68	0.98 ~ 3.69	0.640	0.637	

注:^a $P \leq 0.05$ P14 vs P21; ^b $P \leq 0.05$ P14 vs P28; ^c $P \leq 0.05$ P14 vs P35; ^d $P \leq 0.05$ P14 vs P56; ^e $P \leq 0.05$ P21 vs P28; ^f $P \leq 0.05$ P28 vs P56。

P14 与 P21、P28 的 Cone-ERG b 波峰潜时分别存在统计学差异;而 P14 与其他各时间点间的 Cone-ERG b 波幅值、OPs O₁、OPs O₂ 波峰潜时和波幅值、Rod-ERG b 波、Max-ERG b 波均存在统计学差异(表 1)。P14 时,其中 9 只小鼠 OPs 的峰潜时较成年小鼠明显延长,而 1 只小鼠的 OPs 表现为只有 1 个波。P21 时,OPs 形成 5~6 个波。在生长期,OPs 各波峰潜时逐渐缩短,测量 O₂ 波数据作为 OPs 的值(图 1)。在出生后各时间点之间 Flick-ERG 波幅值无统计学差异,但波形略有不同(图 1)。

3 讨论

ERG 是视网膜受到光线刺激后,节细胞之前各层细胞的电活动。ERG 包括 5 个检查项目,各检查项目表示的视网膜细胞成分为:Rod-ERG:视杆细胞系统;Max-ERG:所有视杆和视锥系统;OPs:内核层;Cone-ERG:视锥系统及少量视杆系统;Flick-ERG(30Hz):视锥系统。而本研究以此标准对小鼠 ERG 的发育变化进行了初步的研究。

视网膜中包含有光感受器细胞、双极细胞、无长突细胞、Müller 细胞等 7 种细胞,各种细胞发育成熟的时间并不一致^[3]。很多物种视网膜在发育阶段经历两个阶段^[4]。早期发育中,包括锥体细胞和神经节细胞等在内的部分细胞首先发育成熟;而在发育晚期,大部分的视杆细胞等细胞才发育成熟。小鼠视网膜^[5]的发育也大致分为两个时期。从胚胎期第 10d(E10)至胚胎期第 14d(E14)为早期,而晚期则是从 E17 持续至出生后。视杆祖先细胞在有丝分裂停止后的 5.5~12.5d,视杆细胞方才表达其特异性抗原 Rhodopsin,这提示视杆细胞在出生后仍处于发育阶段^[6-7]。另有研究显示视杆细胞的形态在出生后仍在发育,P10 时内节已发育成熟,然而外节需到 P21 时才发育成熟^[8]。同时视网膜各种细胞的程序性凋亡对于视网膜发挥正常的功能是非常重要的^[9]。

本实验中,Rod-ERG b 波在 P21 达到成年水平,而这个时间恰好是视杆细胞发育成熟的时间。有研究显示大鼠视杆细胞外节长度以及 Rhodopsin 水平与 Rod-ERG b 波有显著相关性^[10]。因此 Rod-ERG b 波可能与视杆细胞、视杆双极细胞以及无长突细胞有关。

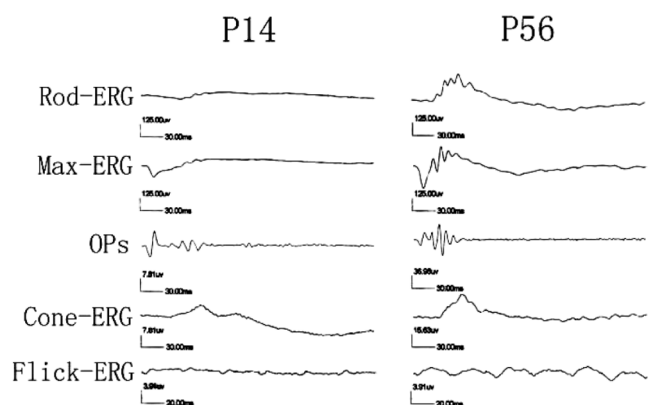


图 1 小鼠在 P14 和 P56 的 ERG。

既往的研究显示,光感受器细胞形成 Max-ERG a 波。本研究中,Max-ERG a 波的峰潜时于 P14 已达到成年水平,而幅值达成成年水平的的时间则是 P21,这可能提示视杆细胞和视锥细胞在接受光刺激后形成电活动的时间是一致的。Max-ERG b 波于 P21 时达成成年水平,而在 P14 时 b 波幅值较低。Wurziger 等^[11]认为 ERG b 波起源于 on-双极细胞和第三级神经元(无长突细胞)。

P14 时 OPs O₁ 波峰潜时已达成成年水平,而幅值则于 P21 方达成成年水平,这与 Max-ERG a 波相似。而 OPs 第二波群幅值和峰潜时均在 P21 时达到成年水平,与 Max-ERG b 波的发育时间相似。但通常认为产生这两种波形的细胞是不同的。在人类 OPs 中,各个波亦来自不同的细胞,其中杆体细胞系统可能形成 O₃ 和 O₄ 波^[12-13]。本研究表明 O₁ 波达到成年水平的的时间要早于第二波群,这亦可间接提示第二波群起源于视杆系统,而 O₁ 波则起源于视锥系统。

小鼠 Cone-ERG 无明显的 a 波,在出生后各时间点间 b 波峰潜时无统计学差异,而在 P21 时幅值方才达到成年水平。出生后各个时间点间 Flick-ERG 的幅值无统计学差异。既往研究显示产生 Flick-ERG 的细胞包括双极细胞以及光感受器细胞^[14]。本研究间接证实视锥相关双极细胞在 P14 已经发育成熟,而在 P14 后视杆细胞继续发育

可能导致了 Cone-ERG b 波幅值在 P21 方达成年水平。因此无长突细胞及双极细胞可能是产生 Cone-ERG b 波的细胞。Flick-ERG 的波形在 P14 与成年时不同,提示视锥系统亦有继续发育的可能。

该研究结果间接证明了视网膜明视和暗视系统具有不同的发育时间点^[3],并与人类不同发育时期的 ERG 相似^[1]。本研究显示昆明种小鼠在不同发育阶段 ERG 波形不尽相同,在 P21 时 ERG 的各项参数已达到成年时的水平,其中在 P14 时视锥系统起源波形已达成年水平。因此记录小鼠 ERG 需考虑不同发育阶段对波形的影响。

参考文献

- 1 Westall CA, Panton CM, Levin AV. Time courses for maturation of electroretinogram responses from infancy to adulthood. *Doc Ophthalmol* 1998;96(4):355
- 2 张作明,顾永昊,李莉,等. 类似先天性静止性夜盲症视觉电生理异常大鼠 1 例. *第四军医大学学报* 2002;23(1):5-7
- 3 Young RW. Cell differentiation in retina of mouse. *Anat Rec* 1985;212(2):199
- 4 LaVail MM, Rapaport DH, Rakie P. Cytogenesis in the monkey retina. *J Comp Neurol* 1991;309(1):86
- 5 Kilpatrick TJ, Bartlett PE. Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF. *J Neurosci* 1995;15(5pt1):3653-3661

- 6 Cepko CL. The patterning and onset of opsin expression in vertebrate retina. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6(4):542-546
- 7 Morrow EM, Belliveau MJ, Cepko CL. Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. *J Neurosci* 1998;8(10):3738-3748
- 8 Richard S. Smith. Systematic evaluation of the mouse eye: anatomy, pathology and biomethods. Boca Raton, Florida, CRC Press 2002:46-62
- 9 Mervin K, Stone J. Developmental death of photoreceptors in the C57BL/6J mouse: association with retinal function and self-protection. *Exp Eye Res* 2002;75(6):703-713
- 10 Fulton AB, Hansen RM, Findl O. The development of the rod photoresponse from dark-adapted rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(6):1038-1045
- 11 Wurzig K, Lichtenberger T, Hanitzsch R. On-bipolar cells and depolarising third-order neurons as the origin of the ERG-b-wave in the RCS rat. *Vis Res* 2001;41(8):1091-1101
- 12 Janaky M, Goupland SG, Benedek G. Human oscillatory potentials: components of rod origin. *Ophthalmologica* 1996;210(6):315-318
- 13 Rousseau S, Lachapelle P. The electroretinogram recorded at the onset of dark-adaptation: understanding the origin of the scotopic oscillatory potentials. *Doc Ophthalmol* 1999;99(2):135-150
- 14 Kondo M, Sieving PA. Primate photopic sine-wave flicker ERG: vector modeling analysis of component origins using glutamate analogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(1):305-312