论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0346-04

ATP对大鼠逼尿肌不稳定膀胱的作用研究

郭建军,方 强,宋 波,李龙坤,李为兵 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 初步探讨ATP对大鼠逼尿肌不稳定膀胱的作用。**方法** 建立雌性SD大鼠BOO DI模型,以正常雌性逼尿肌稳定(detrusor stability, DS)大鼠作对照,制作离体膀胱并Krebs液孵育,膀胱内分别给予0.9% NaCl、ATP、PPADS液后用0.9% NaCl液以0.1 ml/min的速度灌注膀胱,同法灌注膀胱时向浴液中加入ATP以及先浴液中加入PPADS孵育膀胱10 min后再灌注膀胱,并向浴液中加入ATP,记录灌注膀胱和停止灌注后各4 min内的膀胱压力曲线,测量20 s、50 s、4 min、8 min时的膀胱压力值。**结果** 离体膀胱内给予NaCl、ATP、PPADS后,2组大鼠膀胱压力曲线形态和组内和组间各时间点膀胱压无显著性差别($P>0.05$)。灌注时浴液中加入ATP,离体膀胱出现膀胱收缩,50 s时DS组膀胱压高于BOO DI组;先PPADS孵育膀胱后再加入ATP,膀胱收缩幅度显著降低,50 s时组间膀胱压无差别。**结论** 膀胱内给予或膀胱上皮细胞释放的ATP通过神经反射引起尿频和参与逼尿肌不稳定收缩,支配逼尿肌的嘌呤能神经释放的ATP可直接作用于逼尿肌引起收缩。

关键词: ATP;离体膀胱;逼尿肌不稳定

中图法分类号: R322.62;R334.3;R694.5 **文献标识码**: A

Effect of adenosine triphosphate on detrusor muscle from unstable bladder of rat

GUO Jian-jun, FANG Qiang, SONG Bo, LI Long-kun, LI Wei-bing (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the role of adenosine triphosphate (ATP) in the detrusor muscle from unstable bladders of rats. **Methods** There were 30 female Sprague-Dawleys (SD) rats in bladder outlet obstruction (BOO) group and 15 female SD rats in control group. The bladders from 10 rats from each group were incubated in 37 ℃ Kreb solution. After a bolus infusion of sodium chloride, ATP and pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2'4'-disulfonic (PPADS) were infused into the *in vitro* bladder respectively, and then the bladders were pumped with sodium chloride at 0.1 ml/min for 4 min. A cystometry was performed at the same time for 8 min. Later, ATP was added into the incubation solution with or without incubation of PPADS previously and cystometry was recorded simultaneously. The bladder pressure curves were recorded and the pressure of *in vitro* bladders at the time points of 20 s, 50 s, 4 min, 8 min were measured. **Results** For the bladder pressure curve and bladder pressure at different time points, there was no significant difference in each group and between the two groups when the drugs were given into bladders. There was a distinctive bladder contraction when ATP was added into the incubation solutions . The bladder pressure of control group was higher than that of BOO group at 50 s ($P<0.01$). However, the amplitude of bladder contraction was decreased dramatically when the bladder was incubated previously with PPADS. There was no dramatical difference in the bladder pressure between the two groups. **Conclusion** ATP given intravesically or released by the urothelium cells plays a role in the urinary frequency and detrusor instable contraction through nervous reflex. The ATP released by the bladder purinergic nerves can induce detrusor contraction directly.

key words: ATP; *in vitro* bladder; detrusor instability

已有研究证实膀胱上皮细胞在膀胱充盈过程中释放三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),ATP作用于黏膜下感觉神经丛上的P2X受体(主要是$P2X_3$)参与膀胱的容量感觉和排尿反射形成[1,2]。我们在前期的研究中发现:清醒大鼠膀胱内灌注嘌呤能受体激动剂ATP后膀胱出口梗阻(bladder outlet obstruction, BOO)逼尿肌不稳定(detrusor instability, DI)大鼠和正

基金项目:重庆市应用基础研究(2003-31-18)
Supported by the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing (2003-31-18)
作者简介:郭建军(1970-),男,四川省仁寿县人,硕士,副主任医师,主要从事膀胱功能障碍疾病方面的研究。电话:(023) 68765341
通讯作者:李为兵,电话:(023) 68765341
收稿日期:2006-08-28;修回日期:2006-11-07

常逼尿肌稳定(detrusor stability, DS)大鼠膀胱功能容量减小,排尿间隔时间缩短,并且引发正常 DS 大鼠出现 DI 收缩;灌注嘌呤能受体阻滞剂 PPADS 后膀胱功能容量增加,排尿间隔时间延长,BOO DI 大鼠 DI 收缩的发生频率明显降低(结果待发表)。然而膀胱内给予和膀胱上皮细胞释放的 ATP 在 DI 中的作用是直接作用于逼尿肌细胞还是膀胱上皮下感觉神经丛上的 P2X 受体通过神经反射参与尚不明确,故本研究对此进行探讨。

1　材料与方法

1.1　动物

健康雌性 SD (Sprague-Dawley)大鼠 45 只,体质量 220 ~ 250 g,4 ~ 5 月龄,购自第三军医大学实验动物中心。用随机数字表法分为膀胱出口部分梗阻组 30 只,正常组 15 只。

1.2　主要试剂

三水三磷酸腺苷二钠(ATP Disodium $3H_2O$):非选择性嘌呤能受体激动剂,购自上海生工生物工程技术服务公司。磷酸吡哆醛 (pyridoxalphosphate-6-azophenyl -2 ' 4 '-disulfonic, PPADS):非选择性嘌呤能受体阻滞剂,购自 Sigma 公司。用无菌双蒸水将 ATP 配成 200 mmol/L 和 400 mmol/L 母液,PPADS 配成 1 mmol/L 母液, -20 ℃冰箱中冷藏备用。

Krebs 液参照文献[1]的方法,每次实验前新鲜配制(mmol/L): NaCl 120; KCl 5.9; NaH_2PO_4 1.2; $MgSO_4$ 1.2; $NaHCO_3$ 15.4; $CaCl_2$ 2.5; 葡萄糖 11.5,pH 值调为 7.4。均为国产分析纯。

1.3　主要仪器

德国 WIEST SIRIUS 8000 型尿动力学检测仪。美国 3M 公司 AVI270 型微量灌注泵。重庆实验设备厂 501 型恒温水浴器官槽。奥立龙 868 PH 计。

1.4　实验方法

1.4.1　BOO 组和正常组大鼠模型制作　　2 组大鼠模型制作参照文献[3]进行。正常组在相同部位进行相同操作,但不结扎尿道。2 组大鼠同期饲养。

1.4.2　膀胱造瘘　　2 组大鼠模型制作 6 周后同文献[3]的方法进行膀胱造瘘。

1.4.3　充盈性在体膀胱测压　　膀胱造瘘后 3 d,同文献[3]的方法行清醒大鼠充盈性膀胱测压,膀胱灌注速度 0.1 ml/min。DI 诊断标准:贮尿期中膀胱测压曲线上出现 > 10 cmH_2O 的膀胱期相性收缩。

1.4.4　离体膀胱药物实验

1.4.4.1　动物分组　　根据测压结果,选取正常 DS 大鼠 10 只作为 DS 组,随机选取 BOO DI 大鼠 10 只作为 DI 组,用于离体膀胱药物实验。

1.4.4.2　离体膀胱制作　　击大鼠头部致昏,仰卧位,剪开下腹部,带部分尿道快速切取全膀胱,置于 4 ℃ Krebs 液中,去除膀胱周围脂肪和黏连组织,取出膀胱造瘘管,结扎膀胱造瘘口及双侧输尿管。将长 5.0 cm,直径 1 mm 的硬膜外麻醉用导管经尿道置入膀胱,于膀胱颈部结扎于导管上。

1.4.4.3　离体膀胱实验装置　　将相连的双三通管固定于支架上,上端与微量灌注泵、膀胱测压管连接,下端与膀胱导管和给药注射器连接。恒温器官浴槽内充满 10 ml 37 ℃ Krebs 液,持续供给 95% O_2 与 5% CO_2 混合气体。

1.4.4.4　离体膀胱内药物实验　　离体膀胱置于器官浴槽中孵育 30 min,向膀胱内注入 0.1 ml 0.9% NaCl 液后,用 0.9% NaCl 液以 0.1 ml/min 的速度灌注膀胱,开始连续记录膀胱压,4 min 后停止灌注,再记录膀胱压 4 min。经三通管抽尽膀胱内液体, 37 ℃ Krebs 液冲洗膀胱 3 次,更换浴槽 Krebs 液,孵育 30 min 后分别再同法重复进行膀胱内注入 0.1 ml 200 mmol/L ATP 液、300 μmol/L PPADS 液的药物实验,记录膀胱压力曲线。

1.4.4.5　离体膀胱浴液中药物实验　　膀胱内药物实验后,用 37 ℃ Krebs 液冲洗同一离体膀胱 3 次,更换浴槽 Krebs 液 9.5 ml,孵育膀胱 30 min,向膀胱内注入 0.9% NaCl 液 0.1 ml 后,同前速度用 0.9% NaCl 液灌注膀胱,记录膀胱压,灌注20 s 后,沿浴槽壁向浴液中快速加入 400 mmol/L ATP 0.5 ml, 4 min 后停止灌注,再记录 4 min 膀胱压变化。抽尽膀胱内液体,放掉浴液, 37 ℃ Krebs 液冲洗膀胱 3 次, 37 ℃ Krebs 液 9.2 ml 孵育膀胱 20 min,向浴液中加入 1 mmol/L PPADS 0.3 ml,再孵育膀胱 10 min,同前操作进行离体膀胱浴液中加入 400 mmol/L ATP 0.5 ml 的实验,记录膀胱压力曲线。

1.4.4.6　观测指标　　取膀胱灌注 20 s、50 s、4 min、8 min 时的膀胱压值。

1.5　统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 统计软件,组内比较行单因素方差分析,组间比较行 t 检验。

2　结果

2.1　动物模型实验结果

BOO 组 30 只,意外死亡、漏尿、感染共 5 只, 余 25 只经充盈性膀胱测压 18 只确诊为 DI,成功率 72% (18 /25)。正常组 15 只,漏尿、感染、导管阻塞共 3 只,余经充盈性膀胱测压,10 只无 DI,2 只有 DI 发生。

2.2　药物对离体膀胱的影响

2.2.1　单纯膀胱内注入药物对离体膀胱的影响　　DS 组和 DI 组大鼠离体膀胱内给予 ATP、PPADS 后再予生理盐水灌注,与膀胱内给予 0.9% NaCl 比较,3 种药物的膀胱压力曲线形态无明显区别,在 20 s、50 s、4 min、8 min 2 组内各时间点和组间膀胱压力无显著性差异($P > 0.05$)(表 1)。

2.2.2　浴液中药物对离体膀胱的影响　　DS 组和 DI 组大鼠离体膀胱在膀胱灌注 20 s 时膀胱压 2 组间无差异($P > 0.05$);浴液中加入 ATP 后,出现明显膀胱收缩,膀胱压升高, 50 s 时 DS 组膀胱压高于 DI 组($P < 0.01$)。而先予以 PPADS 孵育后再于浴液中加入 ATP,膀胱收缩幅度显著降低,50 s 时 2 组膀胱压均显著低于浴液中只加入 ATP($P < 0.01$),而组间膀胱压已无明显差别($P > 0.05$)。在 4、8 min 时 2 组内和组间膀胱压也无显著性差别($P > 0.05$)(表 2)。

表1 2组大鼠离体膀胱内给予不同药物后各灌注时间点的膀胱压力比较(cmH_2O, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

膀胱内注入药物	20 s		50 s		4 min		8 min	
(0.1 ml)	DS 组	DI 组	DS 组	DI 组	DS 组	DI 组	DS 组	DI 组
0.9% NaCl	2.19±1.86	1.80±0.63	3.40±2.07	3.60±1.96	8.82±4.50	9.50±5.56	3.99±2.18	5.80±3.94
300 μmol/L PPADS	1.69±0.74	1.40±0.52	2.85±1.60	2.90±1.66	7.91±5.60	9.40±4.88	5.11±4.54	6.00±3.43
200 mmol/L ATP	1.82±1.24	1.80±0.63	3.20±1.88	3.30±1.34	8.03±6.46	9.20±4.98	4.13±3.74	5.60±3.63

表2 2组大鼠离体膀胱浴液中加入不同药物后各灌注时间点的膀胱压力比较(cmH_2O, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

浴液中加入药物	20 s		50 s		4 min		8 min	
	DS 组	DI 组	DS 组	DI 组	DS 组	DI 组	DS 组	DI 组
ATP 20 mmol/L	1.93±1.15	1.40±0.52	22.73±3.48[ab]	12.70±4.83[a]	12.59±8.09	11.20±4.71	4.67±4.64	5.70±2.63
PPADS 30 μmol/L + ATP 20 mmol/L	1.74±1.02	1.40±0.52	6.32±2.89	5.60±2.50	10.54±7.26	9.30±4.19	4.23±2.52	5.00±2.54

a: $P<0.01$, 与浓液中加入 PPADS 30 μmol/L + ATP 20 mmol/L 比较; b: $P<0.01$, 与 50 s DI 组比较

3 讨论

3.1 膀胱内灌注 ATP 对 DI 膀胱的可能作用机制

本实验显示,离体孵育膀胱内灌注嘌呤能受体激动剂 ATP、阻滞剂 PPADS 与灌注 NaCl 比较,膀胱压力曲线形态 DS 组和 DI 组大鼠未见明显不同,膀胱内压力值2组内和组间也无明显差异。给予 ATP,未见收缩曲线形态;而给予 PPADS 也未见膀胱压力较给予 NaCl 低。而在前期清醒大鼠在体膀胱实验中,同样方法膀胱内给予同一浓度和量的 ATP,DS 组和 DI 组大鼠均出现排尿间隔时间缩短,膀胱功能容量减小,70%的正常 DS 大鼠出现逼尿肌不稳定收缩;给予 PPADS 作用相反, DI 组大鼠不稳定收缩频率降低,说明膀胱内给予和膀胱上皮细胞释放的 ATP 作用于嘌呤能受体参与膀胱排尿反射和不稳定收缩的发生。因离体膀胱已不受神经调控,膀胱内灌注药物所引起的效应可代表药物的直接作用,所以由在体和离体膀胱内给予药物的效应差别可推测膀胱内灌注和膀胱上皮细胞释放的 ATP 能结合黏膜下感觉神经丛上的嘌呤能受体[4],经过神经反射参与膀胱排尿反射和不稳定膀胱的发生,因受弥散距离的限制和细胞外 ATP 酶的分解作用而不能直接与逼尿肌细胞上的嘌呤能受体结合产生逼尿肌收缩。Namasivayam[5] 和 Rong 等[6] 分别制作正常大鼠和小鼠离体膀胱-盆神经模型,在膀胱内灌注 P2X 受体激动剂(ATP、αβ-meATP)后充盈膀胱,盆神经传入放电比生理盐水充盈膀胱明显增加;灌注阻滞剂(PPADS、TNP-ATP)后充盈膀胱,传入神经放电减少或受抑制,从电生理的角度找到了膀胱内给予和膀胱上皮细胞释放的 ATP 通过嘌呤能神经参与膀胱功能调控的证据。Pandita 等[7] 在清醒正常大鼠的膀胱内分别灌注 ATP、αβ-meATP 引起膀胱不稳定收缩,膀胱容量降低,其作用可被动脉给予的神经结阻断剂六烃季胺阻断,也证明了嘌呤能神经反射调控的作用。因此推测膀胱上皮细胞释放 ATP 和/或膀胱黏膜下神经丛嘌呤能受体表达的异常将导致膀胱功能的改变。

3.2 浴液中加入 ATP 对离体 DI 膀胱的直接收缩作用

在浴液中加入 ATP,DS 组和 DI 组大鼠离体膀胱均出现收缩,且前者膀胱的收缩压显著高于后者;先以嘌呤能受体阻断剂 PPADS 作用后再予 ATP,膀胱收缩作用明显减弱;而离体膀胱内给予 ATP、PPADS 后灌注膀胱,逼尿肌无效应表现。分析原因:浴液中加入的 ATP 与膀胱离体肌条实验相似,没有黏膜屏障,弥散距离短,可直接结合到逼尿肌细胞的嘌呤能受体,引起逼尿肌收缩[8],导致离体膀胱内压升高,由此说明支配膀胱逼尿肌的嘌呤能神经释放的 ATP 递质可直接作用于逼尿肌引起收缩;离体膀胱内、外给予 ATP 后的效应差别进一步证明膀胱内给予和膀胱上皮细胞释放的 ATP 均通过神经反射参与膀胱功能调控,因此不同来源的 ATP 递质可能通过不同的机制参与 DI 膀胱的发生。Bayliss 等研究发现 BOO DI 膀胱逼尿肌嘌呤能收缩成分增加,最可能的原因是由于神经末梢释放 ATP 的增多或 ATP 的降解减少,不是由于逼尿肌细胞对 ATP 敏感性的不同。在实验中,DS 组和 DI 组大鼠离体膀胱浴液中加入相同浓度的 ATP 后,前者膀胱压高于后者,可能与 BOO 膀胱逼尿肌细胞肥厚,细胞间质增生,相对弥散距离增加,细胞外 ATP 酶的分解作用以及 BOO 膀胱功能容量相对大等因素有关。有关 ATP 对逼尿肌的收缩作用我们将在后面的实验中进一步研究。

因此,膀胱内给予或膀胱上皮细胞释放的 ATP 可通过嘌呤能神经反射引起尿频和逼尿肌不稳定的发生;支配膀胱逼尿肌的嘌呤能神经释放的 ATP 可直接作用于逼尿肌引起收缩,有关两者在 DI 中的具体作用机制仍有待深入研究。

参考文献:

[1] Vlaskovska M, Kasakov L, Rong W, *et al*. $P2X_3$ knock-out mice reveal a major sensory role for urothelially released ATP [J]. J Neuros-

ci, 2001, 21(15): 5671-5677.
[2] Cockayne D A, Dunn P M, ZHONG Y, *et al*. $P2X_2$ knockout mice and $P2X_2/P2X_3$ double knockout mice reveal a role for the $P2X_2$ receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP [J]. J Physiol, 2005, 567(Pt 2): 621-639.
[3] 李为兵,方 强,杨 昕,等. ATP对正常及DI大鼠离体逼尿肌肌条自发性收缩的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(14): 1459-1462.
[4] Cockayne D A, Hamilton S G, Zhu Q M, *et al*. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in $P2X_3$-deficient mice [J]. Nature, 2000, 407(6807): 1011-1015.
[5] Namasivayam S, Eardley I, Morrison J F. Purinergic sensory neurotransmission in the urinary bladder: an *in vitro* study in the rat [J]. BJU Int, 1999, 84(7): 854-860.
[6] Rong W, Spyer K M, Burnstock G. Activation and sensitisation of low and high threshold afferent fibres mediated by P2X receptors in the mouse urinary bladder [J]. J Physiol, 2002, 541(Pt 2): 591-600.
[7] Pandita R K, Andersson K E. Intravesical adenosine triphosphate stimulates the micturition reflex in awake, freely moving rats [J]. J Urol, 2002, 168(3): 1230-1234.
[8] Wu C, Bayliss M, Newgreen D, *et al*. A comparison of the mode of action of ATP and carbachol on isolated human detrusor smooth muscle [J]. J Urol, 1999, 162(5): 1840-1847.

(编辑 陈聪连)

文章编号:1000-5404(2007)04-0349-01

个案与短篇

Marfan综合征屈光状态异常1例

陈 利,周素君,宋利兵,刘 波 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

1 临床资料

患者,女性,8岁,因"发现双眼视力差2年"于2003年11月28日来我院就诊。患儿自诉双眼视物模糊,喜很近距离看物,不伴疼痛、畏光。父母非近亲婚配,其母怀孕期间无高热、惊厥及服药史,患儿足月顺产,既往体健,患儿祖父患有类似晶状体脱位。查体脸瘦长、四肢细长、头长形,双眼裸眼远视力均为0.1,裸眼近视力右眼0.4,左眼0.15。矫正远视力:右眼0.2,左眼0.3。33 cm照影:左眼注视时右眼外斜15°,右眼注视时左眼外斜15°。双眼晶状体脱位于鼻上方,扩瞳后见晶体颞下缘。眼压(非接触性眼压计):右眼15 mmHg,左眼18 mmHg。心脏彩色B超提示:主动脉管径增宽。客观电脑验光及带状光检影为:右眼:-12.00 DS-4.00 DC X 145 → 0.2,左眼:-11.75 DS -5.00 DC X 50 → 0.2。主观试片:右眼+7.75 DS + 1.50 DC X 90 → 0.4,左眼:+7.75 DS + 2.00 DC X 145 → 0.3。双眼角膜直径为11 mm,角膜厚度:右眼524 μm,左眼:522 μm。泪膜破裂时间:右眼21 s,左眼20 s。角膜地形图:右眼:SK 8.18 X 95 、FK 8.57 X 5,左眼:SK 7.97 X 77 、FK 8.47 X 167。右眼给予BC弧为8.30的硬性角膜接触镜+14.75 DS → 0.4,左眼给予BC弧为8.20的硬性角膜接触镜+15.00 DS → 0.4。配戴角膜接触镜2个月后行双眼外直肌后徙术,术后继续配戴角膜接触镜。

2006年11月20日再次复诊,右眼矫正远视力0.5,近视力0.33;左眼矫正远视力0.4,近视力0.16^{+2}。33 cm光照,眼位外隐斜小于5°;6 m光照,眼位正。

2 讨论

Marfan综合征是一种不规则的常染色体显性遗传病,为全身中胚叶组织广泛紊乱,以眼、心血管和骨骼系统异常为特征[1]。晶状体摘除术及人工晶体植入术是目前治疗Marfan综合征的有效方法[2],然而,晶状体脱位的白内障摘除及人工晶体植入术,术中极易发生悬韧带断裂,玻璃体脱出等并发症,需严格控制手术适应证。处于视觉发育可塑性关键期的儿童,如因为手术存在风险而不积极矫正屈光不正和进行弱视治疗,即使以后手术成功,视功能亦难以恢复[3]。

本例患者屈光状态较为特殊。在客观检影时瞳孔区内大部分影动为高度近视状态,剩余弧形部分影动为高度远视状态。而主观试片时高度远视状态的矫正视力明显优于高度近视状态的矫正视力。分析原因为,该患者晶状体向鼻上方脱位,检影时光线经过角膜、晶状体和玻璃体。由于悬韧带的断裂,晶状体变凸形成高度近视状态;而主观试片时视轴通过角膜、晶状体的下缘和玻璃体。由于晶状体的缺如呈高度远视状态。从治疗弱视和视觉光学的角度出发,我们依据主观试片的结果给予配戴硬性角膜接触镜,患者远视力明显提高,未出现阅读困难。1年后患者复诊视功能有明显的改善。因此,我们建议对儿童期Marfan综合征或晶状体半脱位的患者,在验光配镜中应关注患者不同屈光状态下的视觉质量,采取主观试片为主,客观检影为辅的原则,予以配戴硬性角膜接触镜,减少了因框架眼镜带来的棱镜效应,提高了患者的视觉质量。同时辅予弱视治疗,最大限度地恢复患者视功能。

关键词:Marfan综合征;屈光异常
中图法分类号:R778 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Morrison D, Sternberg P, Donahue S. Anterior chamber intraocular lens (ACIOL) placement after pars plana lensectomy in pediatric Marfan syndrome[J]. J AAPOS, 2005, 9(3): 240-242.
[2] 朱少华,刘 良. Marfan综合征研究进展[J]. 法医学杂志, 2005, 21(1): 58-60.
[3] 谢江斌,陈跃真,周 凌. Marfan综合征晶状体半脱位的手术治疗探讨[J]. 中国实用眼科杂志, 2005, 23(1): 52-54.

(编辑 龙 亮)

作者简介:陈 利(1975-),女,重庆市人,技师,主要从事眼视光方面的研究。电话:(023)65419454
收稿日期:2006-12-06;修回日期:2006-12-26