

اثر نیکوتین بر رفتار Licking ناشی از آپومرفین در موشهای صحرایی

دکتر محمدرضا زرین دست^۱، دکتر مهتاب شکارچی^۲، دکتر مهدی رضایت^۳

۱- استاد فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۲- فارغ التحصیل داروسازی، ۳- استادیار فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

سابقه و هدف: نیکوتین اثرات فارماکولوژیک گسترده‌ای در سیستم عصبی مرکزی و محیطی دارد. رفتار لیسیدن (licking) در موش صحرایی عمدتاً با عملکرد هسته‌های DM دار و جسم سیاه مرتبط است. هدف این مطالعه تعیین مکانیسم اثر نیکوتین در این رفتار می‌باشد.

مواد و روشها: حیوانات مورد آزمایش، موشهای صحرایی نژاد آلبینو به وزن تقریبی ۲۵۰-۲۵۰ گرم بوده که بطور جداگانه در قفس نگهداری می‌شدند. تعداد لیسیدن در مدت ۶۰ دقیقه در قفس مخصوص شمارش گردید. داروهای مورد استفاده در این مطالعه، آپومرفین هیدروکلراید، سولفات آتروپین، هگزامتونیوم بروماید، مکامیل آمین هیدروکلراید و نیکوتین هیدروژن تارترات بودند. داده‌های بدست آمده بوسیله ANOVA و تست Newman-keuls آنالیز شده و تفاوت بین گروههای آزمایش در هر نقطه با $p < 0.05$ معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها: دوزهای متفاوت آپومرفین (s.c) سبب یک Licking وابسته به دوز می‌شود. حداکثر پاسخ با دوزهای ۰/۵ mg/kg از دارو ایجاد گردید. دوز ۰/۲۵ mg/kg از آپومرفین برای باقی مانده آزمایشات انتخاب شد. با دوزهای مورد استفاده در این آزمایشات تنها استرونتایی رفتار Licking مشاهده گردید. نیکوتین (۲۵۰ - ۰/۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) بصورت (i.p) ۵ دقیقه قبل از آپومرفین بطور قابل توجهی لیسیدن ناشی از آپومرفین را تغییر داد. تجویز نیکوتین تنها (۰/۲۵ تا ۲۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بر رفتار Licking و آثار آرام بخشی اثری نداشت. مکامیل آمین (۰/۵ mg/kg و ۰/۲۵ و ۰/۰۵) بصورت i.p بر روی لیسیدن ناشی از آپومرفین اثر برجسته‌ای نشان داد. پیش مداوا با دوزهای مختلف هگزامتونیوم (۱۰ و ۵ و ۲/۵ و ۳۰ mg/kg) تغییر قابل توجهی بر لیسیدن ناشی از آپومرفین (۰/۲۵ mg/kg بصورت i.p) نداشت.

نتیجه گیری: نتایج نشان می‌دهند که مکانیسم‌های گیرنده‌ای نیکوتینی ممکن است با Licking ناشی از آپومرفین در موشهای صحرایی تداخل داشته باشند. هرچند مکانیسم‌های مرکزی نیکوتینی و کولینرژیکی ممکن است در Licking ناشی از آپومرفین دخیل باشند، مکانیسم محیطی نیکوتینی ممکن است در اثر افزایش نیکوتین در پاسخ به آپومرفین دخیل باشد.

واژه‌های کلیدی: نیکوتین، آپومرفین، آنتاگونیست، کولینرژیک، Licking، موشهای صحرایی.

مقدمه

نیکوتین از نظر فارماکولوژیک فعال‌ترین جزء فرآورده‌های تنباکو است که اثرات گسترده‌ای در سیستم عصبی مرکزی و محیطی نشان می‌دهد (۱-۳). خصوصاً، سیگارها عموماً، یک اثر تحریکی پسرخوشی را پس از کشیدن سیگار تجربه می‌کنند (۴). بسیاری از آثار نیکوتین

احتمالاً ناشی از ترانسانی دارو برای آزاد سازی نوروترانسمیترهای مختلف است (۵). در سیستم عصبی مرکزی، تحریک گیرنده‌های نیکوتین، استیل کولین را از قشر مغز افزایش می‌دهد (۶). مشخص شده است که نیکوتین یک اثر مستقیم تحریکی روی نرونهای Zona

استفاده گردیدند. و بدون علم به اینکه درمان قبلی داشته‌اند یا خیر، برای دومین بار بصورت تصادفی انتخاب می‌شدند.

۳- داروها: داروهای زیر مورد استفاده قرار گرفتند: آپومرفین هیدروکلراید (McFarlan Smith, UK) سولفات آتروپین (Merk, آلمان)، هگزامتونیوم بروماید، (Sigma, UK)، مکامیل آمین هیدروکلراید (Merk, آلمان)، نیکوتین هیدروژن (+) - تارترات (BDH, UK) و محلولهای نیکوتین در سالیین تهیه شدند و pH در حد $7/2 \pm 0/1$ با هیدروکسید سدیم تنظیم گردید. داروهای دیگر در سالیین حل شدند. آنتاگونیست‌ها ۳۰ دقیقه قبل از نیکوتین یا ۳۵ دقیقه قبل از تزریق آپومرفین مورد استفاده قرار گرفتند. نیکوتین همیشه ۵ دقیقه قبل از تجویز آپومرفین تزریق می‌شد. داروها در یک حجم 10 ml/kg تزریق شده و محلولها درست قبل از استفاده تهیه می‌شدند. دوزهای آنتاگونیست‌ها و زمان پیش مداوا قبلاً بوسیله مولف توضیح داده شد (۱۱-۱۳).

۲- آنالیز آماری: آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و دو طرفه و سپس آزمون آماری Newman keuls برای تست داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تفاوت بین گروههای آزمایش در هر نقطه با $p < 0/05$ از نظر آماری معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها

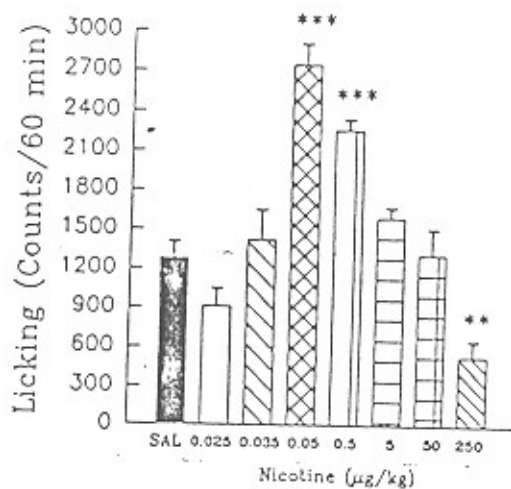
۱- Licking ایجاد شده بوسیله آپومرفین در موشهای صحرانی: شکل ۱ اثر آپومرفین را بر روی رفتار لیسیدن نشان می‌دهد. تزریق زیر جلدی (s.c) دوزهای متفاوت آپومرفین سبب یک Licking وابسته به دوز می‌شود ($F(3,24) = 327/3$ و $p < 0/0001$). حداکثر پاسخ با دوزهای $0/5 \text{ mg/kg}$ از دارو ایجاد گردید. دوز 25 mg/kg از آپومرفین برای باقی مانده آزمایشات انتخاب شد. با دوزهای مورد استفاده در این آزمایشات تنها استرنوتابی رفتار Licking مشاهده گردید.

compacta در جسم سیاه مغز موشهای صحرانی اعمال می‌کند (۷). همچنین سبب افزایش آزاد شدن دوپامین از سیستم لیمبیک (۸) و برش‌های استریاتال (۷) می‌گردد. بررسی‌ها نشان می‌دهند که نیکوتین سیستم دوپامین را تحریک می‌کند و چنین اثری، آثار تحریکی و سرخوشی آن را توصیه می‌نماید (۴). وجود میرهای دوپامینژیکی مزولیمبیک و نیگرواستریاتال ممکن است در ایجاد اثر حرکتی و رفتار استرنوتابی دخیل حائز اهمیت باشند. فعالیت حرکتی (Locomotion) به هسته accumbens مربوط است (۹)، در صورتیکه رفتار استرنوتایپ مثل حرکات سر، Licking (لیسیدن کف قفس)، و بوکشیدن لوکالیزه (Localized sniffing) عمدتاً مرتبط به عملکرد هسته‌های دم دار جسم سیاه (Caudate striatum) می‌باشند (۱۰). هدف این مطالعه، تعیین تداخل احتمالی مکانیسم‌های گیرنده‌ای نیکوتینیک یا موسکارینیک با رفتار لیسیدن ناشی از آپومرفین در موشهای صحرانی بود.

مواد و روشها

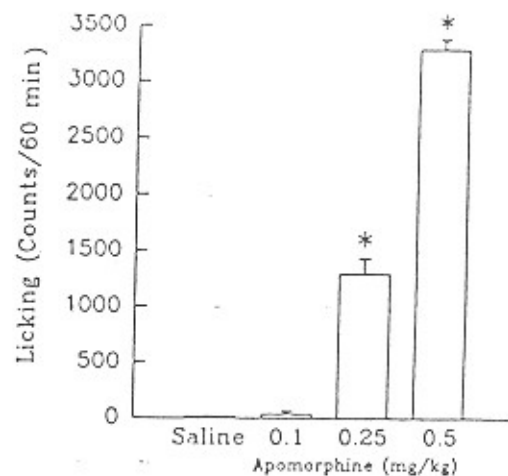
۱- حیوانات آزمایشگاهی: موشهای صحرانی نژاد آلبینو (به وزن تقریبی ۲۵۰-۱۵۰ گرم) در قفس‌های پلاستیکی، در شرایط دمایی 21 ± 2 سانتیگراد و ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در اتاق حیوانات نگهداری شدند. دسترسی به غذا و آب در همه شرایط غیر از زمان آزمایش برای حیوانات وجود داشت.

۲- اندازه‌گیری رفتار Licking: موشهای صحرانی (Rats) بصورت جداگانه در یک استوانه شیشه‌ای (۲۵ در ۲۵ سانتی متر) قرار گرفته و یک آینه در وضعیت ۴۵ درجه در زیر استوانه محل استقرار موشها برای ثبت تعداد لیسیدن حیوانات تعبیه گردید. به حیوانات اجازه داده می‌شد تا به مدت ۳۰ دقیقه قبل از تست با وضعیت عادت نمایند. بلافاصله پس از تجویز دارو، حیوانات در سیلندر قرار گرفته و تعداد لیسیدن‌ها (تماس زبان با کف سیلندر) در مدت ۶۰ دقیقه شمارش گردید. هر حیوان بیش از یک بار در هفته مورد استفاده قرار نمی‌گرفت. حیوانات دوبار



شکل ۲. حیوانات بصورت i.p تحت درمان با سالین (۱۰ ml/kg) یا دوزهای مختلف نیکوتین (۰/۰۲۵-۲۵۰ mg/kg) ۵ دقیقه قبل از آپومرفین (۰/۲۵ mg/kg بصورت s.c) قرار گرفتند. تعداد Licking در مدت ۶۰ دقیقه پس از تزریق آپومرفین شمارش گردید. هر نقطه میانگین $\pm$ SEM هفت حیوان است ($p < 0/01$ و $p < 0/001$). اختلاف با گروه کنترل سالین).

۲- اثرات آنتاگونیست‌های گیرنده‌های نیکوتینی و آتروپین بر تقویت لیسیدن ناشی از آپومرفین بوسیله نیکوتین: آثار پیش مداوا با مکامیل آمین، هگزامتونیوم و آتروپین روی آپومرفین (دوز ۰/۲۵ mg/kg بصورت i.p) و آپومرفین به‌مراه نیکوتین (۰/۰۵ mg/kg و i.p) در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. آنالیز واریانس دوطرفه اثر برجسته مکامیل آمین (۰/۵ mg/kg و ۰/۲۵ و ۰/۰۵) بصورت i.p را بر روی لیسیدن ناشی از آپومرفین نشان می‌دهد ($p < 0/001$) و $F(3,48) = 133/1$. آنالیز بیشتر نشان داد که دوزهای مختلف مکامیل آمین سبب کاهش قابل توجهی از نظر آماری بر پاسخ آپومرفین یا آپومرفین به‌مراه نیکوتین دارد. پیش مداوا با دوزهای مختلف هگزامتونیوم (۰/۵ و ۰/۲۵ و ۰/۰۵ mg/kg) تغییر قابل توجهی بر لیسیدن ناشی از آپومرفین (۰/۲۵ mg/kg بصورت i.p) ندارد. با این



شکل ۱. حیوانات بصورت s.c تحت درمان با سالین (۱۰ ml/kg) و یا دوزهای مختلف آپومرفین (۰/۰۵ و ۰/۲۵ و ۰/۱ mg/kg) قرار گرفتند. تعداد Licking در طی یک دوره ۶۰ دقیقه‌ای پس از تزریق دارو شمارش گردید. هر نقطه میانگین و انحراف معیار استاندارد (Mean $\pm$ SEM) هفت حیوان است ($p < 0/001$) اختلاف با گروه کنترل سالین).

۲- آثار نیکوتین در لیسیدن تحریک شده بوسیله آپومرفین: نیکوتین (در دوزهای ۰/۰۲۵-۲۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) و قتیکه بصورت داخل صفاقی (i.p) ۵ دقیقه قبل از آپومرفین تزریق گردد، بطور قابل توجهی لیسیدن ناشی از آپومرفین را تغییر می‌دهد ($F(7,48) = 22$) و $p < 0/001$. آنالیزهای بیشتر نشان می‌دهد که دوزهای پائین‌تر نیکوتین (۰/۰۵ و ۰/۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) سبب افزایش این حرکت شده در حالیکه دوزهای بالاتر دارو سبب کاهش پاسخ به آپومرفین (در دوزهای ۰/۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) می‌شود (شکل ۲). دوز ۰/۰۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن نیکوتین برای آزمایشات بیشتر انتخاب گردید. تجویز نیکوتین تنها (۰/۰۲۵ تا ۲۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بر رفتار Licking و آثار آرام بخشی اثری نداشت.

جدول ۱. اثرات آنشاکو نیست های نیکوتینی و کولینرژیکی بر رفتار Licking ناشی از آپومرفین یا آپومرفین به همراه نیکوتین در موشهای صحرانی

تعداد لیسیدن در ۶۰ دقیقه (mean±SEM)		
درمان ۱	درمان ۲	آپومرفین + نیکوتین
سالمین نرمال	۱۳۰۰±۱۳۱/۷	۲۷۶۴/۹±۱۴۷/۸
مکامیل آمین (۰/۰۵)	۴۳/۷±۲۱/۵*	۱۰۵۵/۶±۱۳۱/۴*
مکامیل آمین (۰/۲۵)	۰/۰۰±۰/۰۰*	۲۶۲/۳±۲۰۸/۰*
مکامیل آمین (۰/۵)	۰/۰۰±۰/۰۰*	۹/۷±۹/۷*
هگزامتونیوم (۲/۵)	۹۰۸/۱±۱۸۴/۲	۱۴۶۶/۱±۲۵۶/۳*
هگزامتونیوم (۵)	۷۵۵/۶±۳۲۳/۲	۵۷۱/۴±۱۹۹۵/۵*
هگزامتونیوم (۱۰)	۷۰۶/۹±۲۲۶/۷	۴۳۳/۴±۱۱۴/۶*
آتروپین (۲/۵)	۲۴۱/۶±۱۳۰/۸*	۶۸۵/۴±۲۷۵/۵*
آتروپین (۵)	۲۴۵/۴±۱۳۰/۶*	۲۴۴/۱±۹۹/۶*

حیوانات با سالمین (۱۰ ml/kg i.p)، مکامیل آمین (۰/۵ و ۰/۲۵ و ۰/۰۵ mg/kg i.p)، هگزامتونیوم (۱۰ mg/kg i.p) و ۵ و ۲/۵ و ۱۰ آتروپین (۲/۵ و ۵ و ۱۰ mg/kg i.p) ۳۰ دقیقه قبل از تزریق نیکوتین (۰/۰۵ mg/kg) پیش مداوا شدند، آپومرفین (۰/۲۵ mg/kg S.C) ۵ دقیقه بعد از تزریق نیکوتین تجویز گردید. تعداد Licking به مدت ۶۰ دقیقه پس از تجویز آپومرفین شمارش گردید. هر نقطه میانگین ± انحراف معیار استاندارد ۷ موش صحرانی است. (*) اختلاف با گروه کنترل (p < ۰/۰۰۱).

وجود پیش مداوای حیوانات با همان دوزهای هگزامتونیوم، سبب کاهش پاسخ ناشی از ترکیب آپومرفین و نیکوتین (۰/۰۵ mg/kg i.p) می گردد (p < ۰/۰۰۱ و ۶/۷۶ = F(۳ و ۴۸)) در آنالیز واریانس دو طرفه). پیش مداوا با آتروپین (۲/۵ و ۵ میلی گرم بطور p، ۳۰ دقیقه قبل)، میزان Licking ناشی از آپومرفین را کاهش می دهد (p < ۰/۰۰۰۱ و ۶۴/۰۳ = F(۲ و ۳۶)) در آنالیز واریانس دو طرفه). یا لیسیدن ناشی از نیکوتین به همراه آپومرفین را نیز کاهش می دهد (p < ۰/۰۰۱ و ۱۰/۳ = F(۲ و ۳۶)) در آنالیز واریانس دو طرفه).

بحث

در مطالعه حاضر، آپومرفین "آگونست گیرنده های

دوبامین" (۱۴)، رفتار لیسیدن (Licking) را در موش های صحرانی ایجاد می کند که با گزارشات قبلی ما که عوامل دوپامینرژیک قادر به ایجاد Licking هستند، همسو می باشد (۱۱ و ۱۵). همچنین نیکوتین بعضی آثار خود را از طریق مکانیسم های دوپامینرژیک اعمال می کند. این آثار مثل جویدن بدون هدف در موشهای صحرانی (۱۶) و هیپوترمی در موشهای سوری (۱۲)، می باشند. قبلاً نشان داده شد که این دارو دارای آثار دوپامینرژیکی است (۷ و ۸)، ولی نیکوتین به تنهایی قادر به ایجاد رفتار لیسیدن نمی شود. در این مطالعه، نیکوتین بسته به دوز مصرفی سبب افزایش یا کاهش لیسیدن ناشی از آپومرفین می گردد. یافته ها نشان می دهند که مکانیسم های گیرنده های نیکوتین ممکن است با اثر آپومرفین مداخله نمایند. هم

اثرات تضعیفی و هم تحرکی نیکوتین از طریق آثار مرکزی آن ایجاد می‌شود (۱۷ و ۱۸). دو پاسخ مخالف ایجاد شده بوسله نیکوتین در مطالعه حاضر ممکن است بازتاب تحریک یا مهار گیرنده‌های نیکوتینی بوسله دارو باشد.

وجود یک اتصال بین اینترون‌های دوپامینرژیک و کولینرژیک در استریاتوم به اثبات رسیده است (۲۰ و ۱۹) و همچنین تداخل نیکوتینی دوپامین‌گزارش شده است (۷). تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که نیکوتین آزادسازی استیل کولین را در مغز افزایش می‌دهد (۶ و ۲۱-۱۹). به عبارت دیگر نیکوتین می‌تواند بطور مستقیم یا غیر مستقیم گیرنده‌های نیکوتینی را تحریک نماید. نتایج حاضر نشان داد که نیکوتین در دوزهای کم، رفتار Licking تقویت شده بوسله آپومرفین را افزایش می‌دهد. پاسخ آپومرفین همراه نیکوتین بوسله آتروپین (که یک داروی آنتی موسکارینیک است) مهار می‌گردد. همچنین آتروپین Licking ناشی از آپومرفین تنها را کاهش می‌دهد. این مسئله احتمالاً نشان می‌دهد که مکانیسم موسکارینی به نوبه خود در رفتار Licking ناشی از آپومرفین دخیل است.

مطالعات قبلی ما نشان داد که بعضی از پاسخ‌های ایجاد شده بوسله نیکوتین ممکن است از طریق مکانیسم‌های نیکوتینی مرکزی اعمال شوند. از این پاسخ‌ها می‌توان بهبود بخاطر آوردن در یادگیری موش‌های سوری (۲۲)، تضعیف رفتار Jumping ناشی از نالوکسان در موش‌های وابسته به مرفین (۱۳) و رفتار جویدن بی هدف در موش‌های صحرانی (۱۶) را بعنوان مثال ذکر نمود. داده‌های اخیر نشان می‌دهد که آنتاگونیست مرکزی گیرنده‌های نیکوتین یعنی مکامیل آمین (۲۳)، رفتار Licking ناشی از آپومرفین را به تنهایی و یا همراه نیکوتین کاهش می‌دهد. می‌توان استنتاج نمود که مکانیسم مرکزی نیکوتینی رفتار Licking ناشی از آپومرفین را واسطه‌گری می‌کند. هگزامتونیوم که یک آنتاگونیست محیطی گیرنده‌های نیکوتینی است فقط پاسخ ناشی از آپومرفین را در حضور نیکوتین کاهش می‌دهد ولی اثر آپومرفین به تنهایی را تغییر نمی‌دهد. بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری نمود، که اثر افزایش نیکوتین روی Licking ناشی از آپومرفین احتمالاً از طریق یک مکانیسم محیطی واسطه‌گری می‌گردد.

References

1. Benowitz NL. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. N Eng J Med 1988; 319: 1218-1330.
2. Henningfield JE, Goldberg SR. Pharmacologic determinants of tobacco self administration by humans. Pharmacol Biochem Behav 1988; 30: 221-226.
3. Stolerman IP. Characterization of central nicotinic receptors by studies on the nicotine cue and conditioned taste aversion in rats. Pharmacol Biochem Behav 1988; 30: 235-242.
4. Clarke PBS. Dopaminergic mechanism in the locomotor stimulant effects of nicotine. Biochem Pharmacol 1990; 40: 1427-1432.
5. Balfour DJK. The effects of nicotine on brain neurotransmitter systems. Pharmacol Ther 1982; 16: 269-282.
6. Nordberg A, Romanelli L, Sundwall A, Bianchi C, Beani L. Effect of acute and subchronic nicotine treatment

- on cortical acetylcholine release and on nicotinic receptors in rats and guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 71-78.
7. Lichtensteiger W, Hefti F, Felix D, Huwyler T, Melamed E, Schlumpf M. Stimulation of nigrostriatal dopamine neurones by nicotine. *Neuropharmacology* 1982; 21: 963-968.
 8. Imperato A, Di chiara G. Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur J Pharmacol* 1986; 132: 337-338.
 9. Jackson DM, Anden NE, Dahlstrom A. A functional effect of dopamine in the nucleus accumbens and in some other dopamine-rich parts of the rat brain. *Psychopharmacology* 1975; 5: 139-149.
 10. Kelly PH, Seivour PW, Lverson SD. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens, septi and corpus striatum. *Brain Res* 1975; 94: 507-522.
 11. Zarrindast MR, Sharifzadeh M. Effects of adenosine drugs on apomorphine-induced licking in rats. *Gen Pharmacol* 1995; 26: 1119-1123.
 12. Zarrindast MR, Zarghi A, Amiri A. Nicotine-induced hypothermia through an indirect dopaminergic mechanism. *J Psychopharmacol* 1995; 20-24.
 13. Zarrindast MR, Farzin D. Nicotine attenuates naloxone-induced jumping behaviour in morphine-dependent mice. *Eur J Pharmacol* 1996; 298: 1-6.
 14. Seeman P. Brain dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 1980; 32: 229-313.
 15. Zarrindast MR, Roushan-Zamir F, Amir-Rahmat F. Potentiation of licking in rats by stimulation of both D1 and D2 dopamine receptors. *J Psychopharmacol* 1992; 6: 395-398.
 16. Samini M, Shayegan Y, Zarrindast MR. Nicotine-induced purposeless chewing in rats: possible dopamine receptor mediation. *J Psychopharmacol* 1995; 9: 16-19.
 17. Clarke PBS, Kumar R. The effects of nicotine on locomotor activity in non-tolerant and tolerant rats. *Br J Pharmacol* 1983 a; 78: 329-337.
 18. Clarke PBS, Kumar R. Characterization of the locomotor stimulant action of nicotine in tolerant rats. *Br J pharmacol* 1983 b; 80: 587-594.
 19. Damsma G, Robertson GS, Tham C, Fibiger HC. Dopaminergic regulation of striatal acetylcholine release: importance of D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259: 1064-1072.
 20. Bertorelli R, Consolo S. D1 and D2 dopaminergic regulation of acetylcholine release from striata of freely moving rats. *J Neurochem* 1990; 24: 2145-2148.
 21. Consolo S, Girotti P, Russi G, Di Chiara G. Endogenous dopamine facilitates striatal in vivo acetylcholine release by acting on D1 receptor localized in the striatum. *J Neurochem* 1992; 59: 1555-1557.
 22. Zarrindast MR, Sadegh M, Shafaghi B. Effects of nicotine on memory retrieval in mice. *Eur J Pharmacol* 1996; 295: 1-6.
 23. Martin BR, Onaivi ES, Martin TJ. What is the nature of mecamylamine's antagonism of the central effects of nicotine?. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 3391-3397.