

## 参考文献

- 1 金英虎, 王锡山. 癌性疼痛的治疗[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2015, 2015(1): 71-72
- 2 张志谦, 赵宝明, 耿学斯. 痛觉敏化的分子生物学研究进展[J]. 上海医学, 2012, 35(10): 900-903
- 3 黄露露, 于世英. 神经病理性疼痛的中枢敏化发病机制[J]. 中国疼痛医学杂志, 2011, 17(8): 463-465
- 4 芮海涛, 张庆国, 徐世元. 大鼠蛛网膜下腔置管及背根神经节分离方法的改进[J]. 广东医学, 2007, 28(12): 1915-1917
- 5 Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, et al. A rat model of bone cancer pain [J]. Pain, 2002, 96(1-2): 129-140
- 6 Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, et al. Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(3): 791-796
- 7 Mantyh WG, Jimenez-Andrade JM, Stake JJ, et al. Blockade of nerve sprouting and neuroma formation markedly attenuates the development of late stage cancer pain [J]. Neuroscience, 2010, 171(2): 588-598
- 8 Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20): 6243-6249
- 9 Honore P, Mantyh PW. Bone cancer pain: from mechanism to model to therapy [J]. Pain Med, 2000, 1(4): 303-309
- 10 Song XS, Cao JL, Xu YB, et al. Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(7): 789-798
- 11 周琳娜, 王细勇, 袁琳娜. 炎性疼痛引起脊髓后角 ERK 的表达变化及其年龄差异[J]. 骨科, 2006, 30(6): 499-501
- 12 Halvorson KG, Sevcik MA, Ghilardi JR, et al. Similarities and differences in tumor growth, skeletal remodeling and pain in an osteolytic and osteoblastic model of bone cancer [J]. Clin J Pain, 2006, 22(7): 587-600
- 13 Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception [J]. Nature, 2001, 413(6852): 203-210
- 14 梁啸, 刘洪美, 李庆伟, 等. 对 SNI 和 CCI 两种大鼠神经病理性疼痛模型的实验观察[J]. 济宁医学院学报, 2013, 36(1): 22-24
- 15 孙艳, 胡计婵, 王加玉, 等. 骨癌痛大鼠脊髓背角 MEK/ERK 信号转导通路及 CX3CR1 的关系 [J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(8): 920-923
- 16 陈建勇, 王聪, 王娟, 等. MAPK 信号通路研究进展 [J]. 中国医药科学, 2011, 1(8): 32-34
- 17 王丽华, 姜虹. 不同剂量神经生长因子对神经源性疼痛大鼠脊髓 Fos 蛋白的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(50): 9866-9869
- 18 邓博, 贾立群. 骨癌疼痛的机制及药物治疗研究进展 [J]. 中日友好医院学报, 2010, 24(2): 114-116
- 19 Mantyh PW. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life [J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(10): 797-809
- 20 Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice [J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83(9): 1032-1045

(收稿日期:2016-11-16)

(修回日期:2016-12-13)

## SSR 在心肌重构过程中的表达改变

肖 杨 吴青青 唐其柱

**摘要** 目的 探讨 SSR 在心肌重构过程中的表达改变。方法 采用冠状动脉左前降支结扎术建立小鼠心肌梗死后的心肌重构模型、异丙肾上腺素(ISO)皮下注射 2 周建立小鼠急性心脏损伤模型;胸主动脉结扎术(aortic banding, AB)建立小鼠心肌肥厚的模型。采用 RT-PCR 检测各种心肌重构模型中 SSR 转录水平的改变。结果 SSR 亚单位 1(SSR1)和 3(SSR3)在小鼠心肌梗死(miocardial infarction, MI)术后 2 周表达明显降低( $P < 0.05$ );在 ISO 诱导的急性心脏损伤后 2 周表达降低( $P < 0.05$ );在 AB 术后 1 周表达降低( $P < 0.05$ )。然而 SSR1 和 SSR3 的表达在 AB 术后 2 周开始增高( $P < 0.05$ ),持续到 AB 术后 8 周( $P < 0.05$ )。结论 SSR1 和 SSR3 的表达在不同模型的心肌重构中均发生明显改变,且呈现动态变化,提示其可能参与心肌重构的发生、发展。

**关键词** 信号序列受体 心肌梗死 异丙肾上腺素 胸主动脉缩窄术 心肌重构

**中图分类号** R318 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.05.031

**Expression Alteration of SSR in the Process of Cardiac Remodeling.** Xiao Yang, Wu Qingqing, Tang Qizhu. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

**Abstract Objective** To investigate the expression changes of SSR in the process of cardiac remodeling. **Methods** Myocardial in-

fraction (MI) was induced by left anterior descending coronary artery ligation in mice to establish cardiac remodeling model. Mice subjected to isoproterenol (ISO) subcutaneous injection for 2 weeks to establish acute cardiac injury model. Mice subjected to aortic banding (AB) to establish a mouse model of cardiac hypertrophy. RT-PCR was used to detect the expression change of SSR in various cardiac remodeling models. **Results** The expression levels of SSR subunit 1 (SSR1) and 3 (SSR3) were significantly decreased in mice after 2 weeks of MI ( $P < 0.05$ ), and were also decreased in acute cardiac injury induced by 2 weeks of ISO injection ( $P < 0.05$ ), and reduced after 1 week of AB operation ( $P < 0.05$ ). However, the expression of SSR1 and SSR3 increased at 2 weeks after AB ( $P < 0.05$ ), and sustained to 8 weeks after AB ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of SSR3 and SSR1 in different models of cardiac remodeling were significantly changed, and showed dynamic changes, suggesting that it may participate in the occurrence and development of cardiac remodeling.

**Key words** Signal sequence receptor; Myocardial infarction; Isoproterenol; Aortic banding; Cardiac remodeling

心肌重构是多种因素(长期机械刺激,神经体液因素刺激,缺血、缺氧,血管活性肽刺激)引起的心脏慢性失代偿性过程,主要表现为进行性的心室腔扩张,心肌肥厚,心肌纤维化和心功能恶化<sup>[1]</sup>。临床上心肌缺血和压力负荷引起的心肌重构成为心力衰竭高发率和高病死率的主要病因。心肌梗死后的心肌重构主要表现为心脏炎性反应、纤维化增生、心肌细胞凋亡增多以及心肌细胞肥大以代偿维持心脏的结构完整性,保持正常的心功能。然而持续心脏炎症,纤维化和心肌细胞凋亡、肥大最终引起心室壁僵硬扩张,心功能恶化,最终发展为心力衰竭<sup>[2,3]</sup>。长期的压力负荷诱导的心肌重构主要表现为心肌细胞蛋白合成增加,胚胎基因的表达激活,以及心肌细胞的肥大增长;胶原纤维合成增多,血管密度相对减少,引起心肌细胞缺血缺氧,最终发展成为心力衰竭<sup>[4,5]</sup>。目前临床上对心肌重构尚无十分有效的治疗和预防措施,因此深入了解心肌重构的发生、发展机制,为临床上治疗心肌重构和心力衰竭提供新的治疗靶点势在必行。

信号受体序列(signal sequence receptor, SSR),又名易位相关蛋白(translocon-associated protein, TRAP),位于内质网膜,为蛋白质转运所必须的受体序列。SSR有4个亚单位 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ ,其中 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 为单次跨内质网膜亚单位, $\gamma$ 为4次跨膜亚单位。SSR参与蛋白质转运和蛋白的翻译后修饰,此外其还参与内质网应激介导的蛋白质未折叠蛋白反应<sup>[6,7]</sup>。研究表明SSR4(SSR $\delta$ )参与蛋白糖基化修饰<sup>[8]</sup>。SSR3(SSR $\gamma$ )参与小鼠胎盘血管形成,SSR3基因敲除后小鼠胎盘血管严重畸形<sup>[7]</sup>。SSR1(SSR $\alpha$ )参与心脏心内膜垫的发育成熟,SSR1基因敲除小鼠表现为室间隔流出道近端部分缺失,导致右心室双出口<sup>[9]</sup>。上述研究提示SSR1和SSR3可能参与心血管疾病的发生、发展,然而SSR1和SSR3在心脏中的作用尚无报

道。本研究通过建立各种心肌重构模型,探讨SSR1和SSR2在心肌重构过程中的表达改变。

### 材料与方法

1. 实验动物:所有针对动物的操作都遵循武汉大学人民医院动物护理和使用委员会批准。各组手术过程和实验数据分析都采用单盲模式。本实验采用C57成年雄性小鼠( $n = 60$ ;年龄为8~10周;购于北京华富康生物科技有限公司)。小鼠的饲养在武汉大学心血管病研究所。实验动物购回后,适应实验环境至少1周,随后被随机分为4组:对照组( $n = 10$ ),心肌梗死模型组( $n = 20$ ),ISO皮下注射组( $n = 10$ ),AB手术组( $n = 20$ )。

2. 心肌梗死模型建立:采用冠状动脉左前降支结扎术建立心肌梗死模型。用3%戊巴比妥腹腔注射麻醉小鼠,在胸骨左缘纵行切开皮肤1.5cm,暴露心脏,在左心耳下缘2~3mm处用8-0的聚丙烯缝线结扎冠状动脉,假手术组以相同的方法挂线,但是不结扎。迅速将心脏送回胸腔,缝合胸壁。

3. ISO诱导急性心肌损伤模型建立:小鼠给予5mg/(kg·d)的ISO皮下注射,持续14天。

4. 主动脉缩窄(aortic banding, AB)诱导心肌肥厚模型建立:小鼠给予3%戊巴比妥腹腔注射麻醉。小鼠经口气管插管仰卧于加热垫上,使用啮齿动物呼吸机(Somnosuite模型,美国Kent科技有限公司)进行辅助呼吸。在小鼠胸部二、三肋间做切口,暴露主动脉弓分支。采用26G/27G注射器针头与血管平行放置结扎(Sham组只挂线不结扎),随后快速抽掉针管使血管缩窄,逐层关闭胸腔。之后在切口周围皮下注射0.1ml 0.5%的布比卡因(Sigma-Aldrich)以减轻术后疼痛。

5. RT-PCR:TRIzol(Invitrogen, 15596-026)提取心脏的总RNA,反转录试剂盒(Roche, 04896866001)将每组2mg的总RNA反转录为cD-

NA。利用 LightCycler 480 SYBR Green 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应。每个样品设 3 个复管。并用将其结果与  $\beta$ -actin 基因的表达进行对比。

6. 统计学方法:使用 SPSS 17.0 软件进行分析,所有数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组之间的比较用非配对  $t$  检验;多组之间的比较用多因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 各种模型诱导的心肌重构比较:采用 RT-PCR 检测心肌重构标志物的转录水平,发现 3 种模型诱导的心肌重构模型中,心肌重构(ANP、BNP)和纤维化标志物(I型胶原、III型胶原)的转录明显增加( $P < 0.05$ ),且以 MI 诱导的心肌重构最为明显( $P < 0.05$ ),其次为压力负荷诱导的心肌重构( $P < 0.05$ ,表 1)。

表 1 各种模型诱导的心肌重构标志物的转录水平比较

| 项目      | 对照组   | MI 模型组  | ISO 模型组  | AB 模型组   |
|---------|---|---|--|--|
| ANP     | $7.74 \times 10^{-2} \pm 1.71 \times 10^{-2}$ | $5.59 \pm 1.22^*$                               | $4.05 \times 10^{-1} \pm 1.15 \times 10^{-1}^{* \#}$ | $1.32 \pm 0.23^{* \#}$                               |
| BNP     | $7.14 \times 10^{-2} \pm 9.29 \times 10^{-3}$ | $1.01 \pm 0.12^*$                               | $1.80 \times 10^{-1} \pm 1.36 \times 10^{-2}^{* \#}$ | $2.45 \times 10^{-1} \pm 3.14 \times 10^{-2}^{* \#}$ |
| I 型胶原   | $6.88 \times 10^{-3} \pm 1.28 \times 10^{-3}$ | $7.98 \times 10^{-2} \pm 2.86 \times 10^{-3}^*$ | $1.43 \times 10^{-2} \pm 2.75 \times 10^{-3}^{* \#}$ | $2.92 \times 10^{-2} \pm 3.72 \times 10^{-3}^{* \#}$ |
| III 型胶原 | $8.92 \times 10^{-3} \pm 9.52 \times 10^{-4}$ | $7.85 \times 10^{-2} \pm 2.04 \times 10^{-2}^*$ | $1.81 \times 10^{-2} \pm 3.00 \times 10^{-3}^{* \#}$ | $3.24 \times 10^{-2} \pm 4.67 \times 10^{-3}^{* \#}$ |

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 MI 模型组比较, #  $P < 0.05$

2. SSR1 和 SSR3 在各种模型诱导的心肌重构中表达明显下降:在 MI 术后 2 周,ISO 皮下注射 2 周和 AB 术后 1 周,RT-PCR 结果显示 SSR1 的 mRNA 表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。在 MI 模型组,ISO 模型组和 AB 模型组,SSR1 转录水平差异无统计学

意义( $P > 0.05$ ,表 2)。在 MI 术后 2 周,ISO 皮下注射 2 周和 AB 术后 1 周,RT-PCR 结果显示 SSR3 的 mRNA 表达水平明显降低( $P < 0.05$ )。在 3 种心肌重构模型中,SSR3 转录水平的减少程度差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 2)。

表 2 SSR1 和 SSR3 在各种模型诱导的心肌重构中的转录改变

| 项目   | 对照组   | MI 模型组  | ISO 模型组   | AB 模型组  |
|------|---|---|---|---|
| SSR1 | $1.37 \times 10^{-2} \pm 4.46 \times 10^{-3}$ | $5.52 \times 10^{-3} \pm 6.47 \times 10^{-4}^*$ | $6.03 \times 10^{-3} \pm 1.01 \times 10^{-3}^*$ | $5.52 \times 10^{-3} \pm 1.74 \times 10^{-3}^*$ |
| SSR3 | $4.93 \times 10^{-2} \pm 9.22 \times 10^{-3}$ | $2.03 \times 10^{-2} \pm 6.37 \times 10^{-3}^*$ | $1.82 \times 10^{-2} \pm 1.16 \times 10^{-2}^*$ | $1.48 \times 10^{-2} \pm 2.12 \times 10^{-3}^*$ |

与对照组比较, \*  $P < 0.05$

3. SSR1 和 SSR3 在压力负荷诱导的心肌重构中表达呈动态改变:在 AB 术后 1 周,SSR1 的 mRNA 表达水平明显降低,而在 AB 术后 2 周,SSR1 的转录水平开始增加,且高于对照组( $P < 0.05$ );AB 术后 4 周和 8 周 SSR1 呈现持续高表达状态( $P < 0.05$ )。在

AB 术后 1 周,SSR3 的 mRNA 表达水平明显降低,而在 AB 术后 2 周,SSR3 的转录水平开始增加,明显高于对照组( $P < 0.05$ );AB 术后 4 周和 8 周 SSR3 的 mRNA 表达持续高于对照组( $P < 0.05$ ,表 3)。

表 3 SSR1 和 SSR3 在压力负荷诱导的心肌重构中的动态改变

| 项目   | 对照组   | 1 周   | 2 周  | 4 周  | 8 周  |
|------|---|---|--|--|--|
| SSR1 | $1.37 \times 10^{-2} \pm 4.46 \times 10^{-3}$ | $4.59 \times 10^{-3} \pm 8.97 \times 10^{-4}^*$ | $2.08 \times 10^{-2} \pm 2.72 \times 10^{-3}^{* \#}$ | $2.02 \times 10^{-2} \pm 2.00 \times 10^{-3}^{* \#}$ | $2.24 \times 10^{-2} \pm 1.20 \times 10^{-3}^{* \#}$ |
| SSR3 | $4.60 \times 10^{-2} \pm 4.91 \times 10^{-3}$ | $2.29 \times 10^{-2} \pm 1.74 \times 10^{-3}^*$ | $6.94 \times 10^{-2} \pm 8.26 \times 10^{-3}^{* \#}$ | $6.71 \times 10^{-2} \pm 8.13 \times 10^{-3}^{* \#}$ | $6.57 \times 10^{-2} \pm 3.75 \times 10^{-3}^{* \#}$ |

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 1 周比较, #  $P < 0.05$

## 讨 论

内质网是参与多种细胞过程的重要细胞器,如蛋白质折叠、蛋白分泌、钙稳态、脂质合成、蛋白降解等。多种刺激可干扰内质网的功能,造成内质网内未折叠蛋白和错误折叠蛋白的累积。当内质网跨膜蛋白感

应到内质网内未折叠蛋白的聚集会引发内质网应激<sup>[10, 11]</sup>。长期的内质网应激最终会导致细胞凋亡<sup>[12]</sup>。研究表明内质网应激参与心血管疾病的发生发展。在心力衰竭心脏中,氧化应激、缺血、缺氧以及蛋白质合成增多均会增加心肌细胞内质网应激水

平<sup>[13, 14]</sup>。相关研究显示,在心力衰竭患者心脏内质网应激相关蛋白、葡萄糖调节蛋白(GRP78)表达明显增加,提示心力衰竭患者心脏中未折叠蛋白反应被激活。在压力负荷诱导的心肌肥厚和心力衰竭模型中,内质网应激在心肌肥厚和心力衰竭阶段均明显增高,而内质网应激诱导的凋亡只在心力衰竭心脏增加,提示内质网应激诱导的细胞凋亡是促进心肌肥厚向心力衰竭转变的因素之一<sup>[10, 15]</sup>。

SSR 是内质网跨膜蛋白,研究表明其参与了蛋白的转运、分泌以翻译后修饰<sup>[6]</sup>。此外,研究报道,SSR 在内质网应激增高时表达增多,且 SSR 更偏向于结合未折叠蛋白;SSR 沉默后,内质网相关的蛋白质降解明显减少,提示 SSR 参与内质网应激中未折叠蛋白的降解<sup>[16]</sup>。然而 SSR 在心血管疾病,尤其是心肌重构中的作用尚无报道。本研究采用冠状动脉左前降支结扎术、ISO 注射以及主动脉缩窄术建立不同的心肌重构模型,发现 SSR1 和 SSR3 的表达在 3 种心肌重构模型中均降低,提示 SSR 参与心肌重构的发生、发展。

压力负荷诱导的心肌重构,早期表现为胚胎基因表达增多,蛋白合成增多,心肌细胞的肥大性增长,室壁变厚以适应增高的压力负荷,维持正常的心功能。然而当心肌细胞肥大性增长的程度超过了微血管的供应能力时,心肌细胞缺血、缺氧导致心肌细胞代谢改变,凋亡增多,心脏组织炎性浸润以及纤维化增生,逐渐发展为失代偿性心肌肥厚,最终发展成为心力衰竭<sup>[5]</sup>。本研究结果表明在 AB 术后 1 周,SSR1 和 SSR3 的表达均下降,而在 AB 术后 2 周时其表达开始增高,且持续到术后 8 周。本部分结果提示 SSR1 和 SSR3 在压力负荷诱导的心肌重构代偿期时表达下降,在失代偿期表达增高。SSR1 和 SSR3 在心肌重构代偿期表达降低可能导致心肌细胞中未折叠蛋白降解减少,加重内质网应激的未折叠蛋白反应;SSR1 和 SSR3 在失代偿期表达增高,可能诱导内质网应激相关的细胞凋亡,促进心肌肥厚向心力衰竭的发展。上述假设尚需进一步研究证实。

综上所述,SSR1 和 SSR3 在不同模型诱导的心肌重构中表达均发生改变,且在压力负荷诱导的心肌重构中呈现动态变化,提示 SSR 参与心肌重构向心力衰竭的病理发展。本研究为深入了解心肌重构和心力衰竭的发展机制提供了理论基础,基于 SSR 的分子靶点可能作为心肌重构和心力衰竭的治疗新方向。

## 参考文献

- 1 Spaich S, Katus HA, Backs J. Ongoing controversies surrounding cardiac remodeling: is it black and white – or rather fifty shades of gray [J]. *Front Physiol*, 2015, 6(1): 202
- 2 Weinberger T, Schulz C. Myocardial infarction: a critical role of macrophages in cardiac remodeling[J]. *Front Physiol*, 2015, 6(1): 107
- 3 Garza MA, Wason EA, Zhang JQ. Cardiac remodeling and physical training post myocardial infarction [J]. *World J Cardiol*, 2015, 7(2): 52 – 64
- 4 Nishida K, Otsu K. Autophagy during cardiac remodeling[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 95(1): 11 – 18
- 5 Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 97(1): 245 – 262
- 6 Sommer N, Junne T, Kalies KU, *et al.* TRAP assists membrane protein topogenesis at the mammalian ER membrane [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3104 – 3111
- 7 Yamaguchi YL, Tanaka SS, Oshima N, *et al.* Translocon – associated protein subunit Trap –  $\gamma$ /Ssr3 is required for vascular network formation in the mouse placenta[J]. *Dev Dyn*, 2011, 240(2): 394 – 403
- 8 Losfeld ME, Ng BG, Kircher M, *et al.* A new congenital disorder of glycosylation caused by a mutation in SSR4, the signal sequence receptor 4 protein of the TRAP complex [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(6): 1602 – 1605
- 9 Mesbah K, Camus A, Babinet C, *et al.* Mutation in the Trapalpha/Ssr1 gene, encoding translocon – associated protein alpha, results in outflow tract morphogenetic defects [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(20): 7760 – 7771
- 10 Minamino T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(6): 1105 – 1110
- 11 Kitakaze M, Tsukamoto O. What is the role of ER stress in the heart? Introduction and series overview [J]. *Circ Res*, 2010, 107(1): 15 – 18
- 12 Logue SE, Cleary P, Saveljeva S, *et al.* New directions in ER stress – induced cell death [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(5): 537 – 546
- 13 Wang J, Hu X, Jiang H. ER stress – induced apoptosis: a novel therapeutic target in heart failure [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 177(2): 564 – 565
- 14 Ni L, Zhou C, Duan Q, *et al.*  $\beta$  – AR blockers suppresses ER stress in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27294
- 15 Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, *et al.* Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis [J]. *Circulation*, 2004, 110(6): 705 – 712
- 16 Nagasawa K, Higashi T, Hosokawa N, *et al.* Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation [J]. *EMBO Rep*, 2007, 8(5): 483 – 489

(收稿日期:2016 – 09 – 24)

(修回日期:2016 – 10 – 23)