

УДК [611.835.84-003.93:616.718.5/.6-001.5-089.227.84]-092.9

СТРУКТУРНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ МАЛОБЕРЦОВОГО НЕРВА ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ ПЕРЕЛОМОВ КОСТЕЙ ГОЛЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Варсегова Т.Н., Щудло Н.А., Щудло М.М., Петровская Н.В., Степанов М.А.
*ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия»
им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, Курган, e-mail: varstn@mail.ru*

В эксперименте по моделированию оскольчатого перелома костей голени у 21 беспородной собаки и их лечении методом чрескостного остеосинтеза в малоберцовых нервах обнаруживаются реактивно-деструктивные, компенсаторно-приспособительные и регенераторные реакции, направленные на поддержание гомеостаза. Численная плотность миелиновых проводников снижается только через неделю эксперимента на 8%, а безмиелиновых – в течение первых трех недель на 16–31%, что является свидетельством их большей травматизации. В последующие сроки опыта численность нервных проводников возрастает и максимум значений по времени совпадает со сроком консолидации перелома – от 42,0 до 50,0 суток эксперимента. Полученные результаты дают основание предположить, что периферические нервы играют важнейшую роль в процессах заживления перелома кости посредством арборизации нервных проводников и вырабатываемых ими нейромедиаторов.

Ключевые слова: малоберцовый нерв, численные, размерные характеристики волокон, перелом костей голени, чрескостный остеосинтез

STRUCTURAL PERONEAL NERVE REORGANIZATION FOR HEALING OF CANINE LEG BONE FRACTURES

Varsegova T.N., Shchudlo N.A., Shchudlo M.M., Petrovskaja N.V., Stepanov M.A.
*FSBI RISC «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of RF Ministry of Health,
Kurgan, e-mail: varstn@mail.ru*

Reactive-and-destructive, compensatory-and-adaptive and regenerative reactions directed to homeostasis maintenance found in peroneal nerves in the experiments on modeling an comminuted leg bone fracture in 21 mongrel dogs and their treatment by transosseous osteosynthesis method. Numerical density of myelin conductors 8% decreases only after 1 week of the experiment, and that of myelin-free ones 16–31% decreases within three first weeks, thereby evidencing their greater traumatization. In the experiment subsequent periods the number of nerve conductors increases, and the value maximum coincides in time with the period of fracture consolidation – from 42,0 to 50,0 days of the experiment. The results give reason to assume that the peripheral nerves play a crucial role in the processes of bone fracture healing by arborization of the nerve conductors and produced by them neuromediators.

Keywords: peroneal nerve, numerical, dimensional characteristics of fibers, leg bone fracture, transosseous osteosynthesis

Функциональная реабилитация пострадавших с переломами берцовых костей остается актуальной проблемой травматологии, и одной из причин неудовлетворительных результатов лечения является нейропатия малоберцового нерва [3]. В настоящее время появляются исследования, доказывающие наличие нейрогенного контроля метаболизма костной ткани, что указывает на участие периферической нервной системы посредством нейромедиаторов в регенерации и ремоделировании скелетной ткани, в том числе и при переломах [8]. Имеются экспериментальные данные о неоднозначном характере влияния денервации на заживление переломов: объем периостальной костной мозоли в зоне перелома большеберцовой кости крыс в опытах с перерезкой седалищного нерва повышается, но её плотность и прочность сращения оказываются ниже контроля [6]. Дальнейшие исследования в этой области являются перспективными, так как позволяют изучить механизмы нейрогенного контроля

скелетных тканей и открыть новые направления в лечении остеопороза, артропатии и заживлении переломов [7].

При моделировании оскольчатых переломов костей голени у собак признаки повреждения малоберцового нерва наблюдались в 11,1% случаев, но даже в опытах с отсутствием признаков механического повреждения нерва выявлены изменения эпиневрия и периневрия, свидетельствующие об усилении структурно-функциональных характеристик периневрального барьера и гистогенезе структур, обеспечивающих механическую прочность нерва и поддержание гомеостаза среды микроокружения нервных волокон [4]. Состояние безмиелиновых и миелинизированных волокон в этих условиях нельзя считать детально изученным.

Цель исследования – проанализировать изменения численных и размерных характеристик нервных волокон поверхностного малоберцового нерва (МН) в динамике заживления переломов костей голени.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на 21 беспородной собаке с массой тела 11–20 кг, в возрасте 3–5 лет, которым в условиях операционной под внутривенным комбинированным наркозом моделировали оскольчатый перелом в средней трети правой голени ударом груза массой 5 кг в свободном падении с высоты 1,5 м. В течение суток осуществляли иммобилизацию голени шиной, затем выполняли закрытый чрескостный остеосинтез аппаратом Илизарова. Животные выводились из эксперимента передозировкой барбитуратов в разные сроки фиксации голени в аппарате – 7 (Ф7, $n = 3$), 14 (Ф14, $n = 3$), 21 (Ф21, $n = 3$), 35–37 (Ф35–37, $n = 4$) и 49–50 (Ф49–50, $n = 3$) суток, через 90 (Ф49–50БА90, $n = 3$) и 120 (Ф49–50БА120, $n = 2$) суток после снятия аппарата. Срок окончания периода фиксации и снятия аппарата определяли по рентгенологическим признакам формирования костной мозоли и после проведения клинической пробы, позволяющей констатировать отсутствие микроподвижности в зоне интереса после приложения к ней разнонаправленных усилий. Содержание, питание, уход, оперативные вмешательства и эвтаназию осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755). Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены этическим комитетом.

Участки МН оперированной и контралатеральной конечностей (уровень средней трети голени) фиксировали в смеси 2% растворов глутарового и параформальдегидов на фосфатном буфере (рН 7,4) с добавлением 0,1% пикриновой кислоты, постфиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия с 1,5% красной кровяной солью и заливали в аралдит. В оцифрованных на аппаратно-программном комплексе «DiaMorph» (Москва) изображениях тотальных поперечных полутонких срезов нервов, окрашенных метиленовым синим и основным фуксином, определяли общую площадь поперечного сечения нерва (A_n), суммарную площадь пучков нервных волокон с периневрием (A_{f-pn}), численные плотности эндоневральных микрососудов (NA_{ms}), миелиновых (МВ) и безмиелиновых волокон (NA_{mf} и NA_{amf}) в 1 мм^2 , коэффициент NA_{amf}/NA_{mf} , долю деструктивных измененных МВ (Deg%), средние диаметры МВ (D_{mf}), их аксонов (D_{ax}), коэффициент $G (D_{ax}/D_{mf})$, толщину миелиновой оболочки (L_m). Строили гистограммы распределения МВ по диаметрам с шагом 1 мкм. Производили учёт ядродержащих профилей МВ крупного калибра (более 7 мкм диаметром) и рассчитывали ядерный индекс (J_{nuc}), как процентную долю ядродержащих профилей МВ в выборке из 200 и более проводников. Контроль – МН 5 интактных собак. Статобработку проводили по парному двухвыборочному t -тесту и критерию Вилкоксона для независимых выборок (тесты запрограммированы И.П. Гайдышевым [1] и помещены в динамически подключаемую библиотеку программы Microsoft Excel 97).

Результаты исследования и их обсуждение

Консолидация перелома голени наступает в сроки от 42,0 до 50,0 суток эксперимента ($46,3 \pm 1,5$ суток).

Все оболочки МН у большинства животных сохраняют целостность. При планиметрическом исследовании тотальных поперечных срезов МН у двух собак через 14–21 сутки опыта регистрируется повышение ($p < 0,05$) A_n оперированной конечности на 12–13% и A_{f-pn} на 5–16% ($p < 0,05$) относительно аналогичных параметров контралатерального МН. Через 35–37 суток фиксации достоверные различия по параметру A_n отсутствуют, и только у одной собаки обнаруживается повышение на 5% ($p < 0,05$) A_{f-pn} оперированной конечности. Через 50 суток фиксации и в остальные сроки эксперимента достоверные различия по параметрам A_n и A_{f-pn} отсутствуют.

Через 7, 14 и 21 сутки фиксации голени в аппарате в МН наблюдаются аналогичные морфологические изменения. Эпиневрий отчетливый, обнаруживаются признаки реактивного воспаления. Стенки большинства эпиневральных кровеносных сосудов утолщены, просветы расширены, нередко состояние эритроцитарного стаза. Часть микрососудов имеют облитерированные просветы и признаки дистрофических и деструктивных изменений.

Периневрий сохраняет тонколамеллярное строение, но возрастает количество ядер периневральных клеток (ПК) и увеличиваются объемы волокнистых прослоек. Между слоями ПК формируются многочисленные мостики, представленные цитоплазматическими клеточными выростами. В отдельных пучках наблюдаются незначительные субпериневральные отеки. Эндоневральные кровеносные сосуды в отличие от интактного МН имеют преимущественно расширенные просветы, часть – признаки деструктивных изменений клеточных элементов стенки. Обнаруживаются МВ с признаками демиелинизации, аксональной и валлеровской дегенерации (рис. 1).

Через 7 суток Deg% ($12,51 \pm 3,62$ %) превышает значения интактного МН ($1,85 \pm 0,60$ %) в 6,2 раза, что сопровождается снижением (рис. 1) у большинства животных NA_{mf} (19595 ± 3702), NA_{amf} (11316 ± 2306) и коэффициента NA_{amf}/NA_{mf} до $0,604 \pm 0,214$, что на 22% ниже нормы ($0,776 \pm 0,121$). В интактных МН показатели NA_{mf} и NA_{amf} составляют в среднем 21335 ± 1130 и 16479 ± 1944 в 1 мм^2 соответственно. J_{nuc} приближен к значениям интактного МН. L_m не изменяется, а уменьшение ($p < 0,01$) D_{ax} свидетельствующее о нарушении аксоплазматического тока и приводит к снижению ($p < 0,01$) D_{mf} и коэффициента G (таблица).

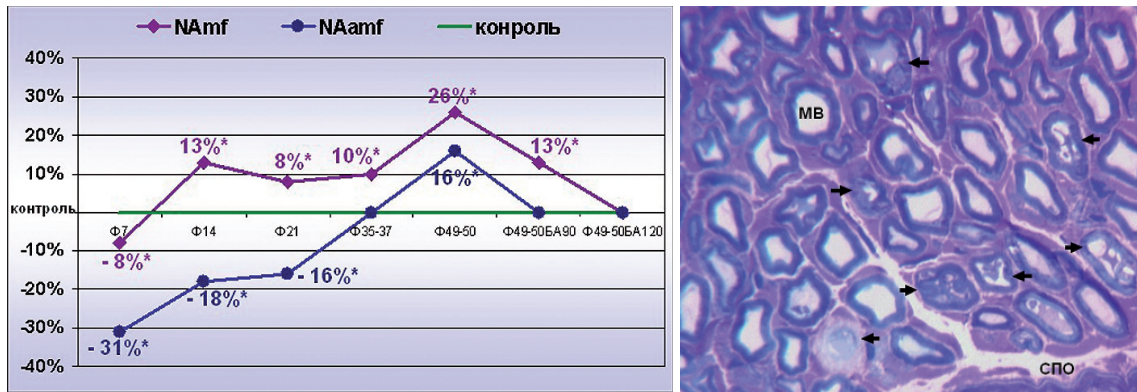


Рис. 1. Слева: график динамики NA_{mf} и NA_{amf} на этапах эксперимента, отражающий разницу в процентах между NA_{mf} и NA_{amf} опытного и интактного нервов. * – различия между NA_{mf} и NA_{amf} опытного и интактного нервов достоверны по критерию Вилкоксона для независимых выборок при $p < 0,01$. Справа: нервные волокна МН через 20 суток фиксации голени в аппарате. МВ – миелиновые волокна, стрелки – деструктивно измененные МВ, СПО – субпериневральный отек. Поперечный полутонкий срез, окраска метиленовым синим и основным фуксином. Об. 40, ок. 12,5x

Размерные характеристики МВ опытного и интактного МН нервов ($m \pm \sigma$)

Срок exper.	D_{mf} (мкм)	D_{ax} (мкм)	$G (D_{ax}/D_{mf})$	L_m (мкм)	J_{nuc} (%)
Ф 7	$6,29 \pm 0,70^*$	$4,18 \pm 0,53^*$	$0,670 \pm 0,016$	$1,06 \pm 0,11$	$2,77 \pm 0,43$
Ф 14	$6,08 \pm 0,08^*$	$4,17 \pm 0,01^*$	$0,686 \pm 0,008$	$0,95 \pm 0,04^*$	$5,13 \pm 1,06$
Ф 20	$5,98 \pm 0,32^*$	$4,04 \pm 0,35^*$	$0,697 \pm 0,018$	$0,97 \pm 0,01^*$	$5,06 \pm 2,29$
Ф 37-39	$5,78 \pm 0,15^*$	$3,73 \pm 0,19^*$	$0,650 \pm 0,011$	$0,67 \pm 0,48^*$	$3,80 \pm 0,25$
Ф 50	$5,03 \pm 0,56^*$	$3,40 \pm 0,20^*$	$0,676 \pm 0,066$	$0,82 \pm 0,13^*$	$3,89 \pm 0,45$
Ф50БА90	$5,89 \pm 0,07^*$	$3,98 \pm 0,14^*$	$0,676 \pm 0,012$	$0,96 \pm 0,05^*$	$4,03 \pm 0,44$
Ф50БА120	$6,21 \pm 0,39^*$	$4,15 \pm 0,24^*$	$0,671 \pm 0,004$	$1,07 \pm 0,09$	$2,90 \pm 0,49$
Инт. МН	$6,46 \pm 0,07$	$4,39 \pm 0,08$	$0,679 \pm 0,010$	$1,04 \pm 0,04$	$2,63 \pm 0,00$

Пр и м е ч а н и е. * – различия между значениями размерных характеристик опытного и интактного МН достоверны по критерию Вилкоксона для независимых выборок при $p < 0,01$.

Исследование эндоневральной васкуляризации показало, что через 7 и 14 суток опыта у всех животных регистрируется снижение NA_{ms} (188 ± 30 и 172 ± 25 соответственно) относительно контроля (в интактном МН – 220 ± 39), но только у 2-х собак снижение NA_{ms} на 29–30% является статистически достоверным ($p < 0,01$).

Deg% через 14 суток остается высокой – $11,79 \pm 0,30\%$. В результате регенераторных процессов NA_{mf} возрастает до 24462 ± 2883 и превышает контроль (рис. 1). NA_{amf} возрастает до 13394 ± 992 , но остается сниженной относительно контроля (рис. 1), коэффициент NA_{amf}/NA_{mf} ($0,549 \pm 0,024$) – на 29%. Все размерные характеристики МВ оказываются ниже нормы (таблица). Снижение D_{mf} происходит за счет снижения L_m , что сопровождается ростом G (таблица) и J_{nuc} . Изменение показателя J_{nuc} дает возможность косвенно оценить динамику изменения дли-

ны интернодальных сегментов на этапах эксперимента, и повышение данного показателя свидетельствует об увеличении числа коротких «вставочных» интернодальных сегментов вследствие происходящих в нерве процессов демиелинизации и последующей ремиелинизации.

Через 7 и 14 суток распределение МВ по диаметрам, как и в контроле, имеет бимодальный характер (рис. 2). Основание гистограммы увеличивается с правой стороны на 1 разряд: появляются МВ диаметром 13,1–14,0 мкм. Доля МВ малого калибра (2,1–4,0 мкм) возрастает на 7–10%, крупных ($D_{mf} > 7,1$ мкм) – снижается на 3%, что приводит к сглаживанию правого пика гистограммы и повышению левого.

Через 20 суток Deg% немного снижается ($8,85 \pm 4,77\%$), но превышает норму в 4 раза. NA_{ms} повышается до 281 ± 32 и превышает контроль на 28% ($p < 0,01$).

NA_{mf} (23123 ± 4307) остается выше нормы, а NA_{amf} возрастает до 13832 ± 2795 , но не достигает контроль (рис. 1), а NA_{amf}/NA_{mf} ($0,592 \pm 0,017$) остается сниженным – на 24%. Такое изменение численных плотностей микрососудов и волокон при неизменной A_{f-pn} , либо ее повышении у отдельных животных, свидетельствует о гиперваскуляризации эндоневрия и отражает реальный рост численности популяции МВ при

одновременном снижении численности, либо топографическом перераспределении безмякотных проводников. D_{mf} , D_{ax} и L_m продолжают снижаться, а G – расти, J_{nuc} в 1,9 раза превышает контроль (таблица). Бимодальность распределения МВ сохраняется, основание гистограммы смещается влево: появляются новообразованные МВ диаметром 1,0–2,0 мкм, и исчезают крупные диаметры 13,1–14,0 мкм.

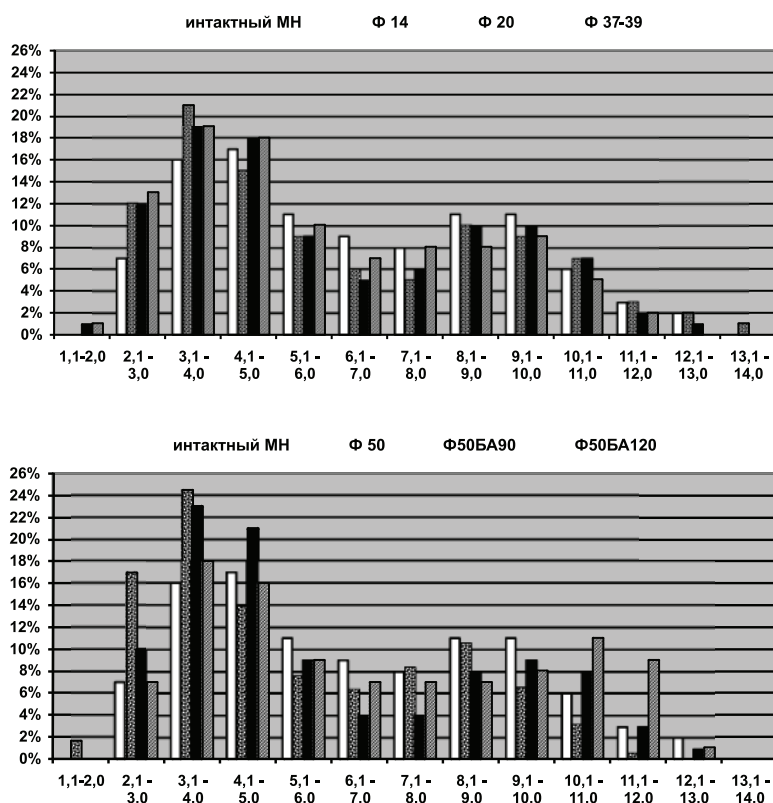


Рис. 2. Гистограммы распределения МВ по диаметрам в интактном МН и опытном на этапах эксперимента. Ось абсцисс – размерные классы, ось ординат – доли МВ каждого класса в %

Через 35–37 суток фиксации в эпиневррии МН обнаруживаются коллагеновые депозиты, наблюдается его гиперваскуляризация. Артериолы и венулы гипертрофированы. Часть сосудов имеет признаки деструктивных изменений клеточных элементов стенок. Периневрий сохраняет тонкоамеллярное строение, волокнистые прослойки между слоями периневральных клеток остаются утолщенными. NA_{ms} превышает норму на 30% (287 ± 93). $Deg\%$ снижается до $4,64 \pm 0,85\%$, что в 2,4 раза выше контроля. Обнаруживаются единичные мелкие новообразованные волокна с тонкой миелиновой оболочкой и регенерационные кластеры. NA_{mf} (23742 ± 2057) остается

повышенной (рис. 1). NA_{amf} (16429 ± 1116) приближается к норме (рис. 1). NA_{amf}/NA_{mf} ($0,693 \pm 0,017$) остается пониженным на 11%. D_{mf} , D_{ax} , L_m продолжают снижаться, а J_{nuc} превышает контроль в 1,4 раза (таблица). Гистограмма уменьшается справа на 1 разряд: не обнаруживаются МВ диаметром 12,1–13,0 мкм, имеющиеся в интактном МН.

Через 48–50 суток в МН сохраняется эпиневрральная и эндоневральная гиперваскуляризация, NA_{ms} на 40% превышает контроль ($p < 0,01$). NA_{mf} и NA_{amf} продолжают расти (рис. 1). $Deg\%$ в 3 раза превышает норму, D_{mf} , D_{ax} , L_m продолжают снижаться, G приближается к норме, J_{nuc} в 1,5 раза пре-

вышает контроль (таблица). Гистограмма распределения МВ по диаметрам, как и на предыдущем сроке, состоит из 11 разрядов: волокна имеют диаметры от 1,0 до 12,0 мкм. Доля МВ диаметром менее 2,1 мкм возрастает до 2%, что свидетельствует о происходящих в нерве регенераторных процессах. Доля мелких МВ (1,0–4,0 мкм) в среднем на 20% превышает норму, доля крупных МВ (> 7,1 мкм) снижается на 3% и остается ниже нормы в среднем на 11%.

Через 140–170 суток эксперимента в МН сохраняется эпиневральная и эндоневральная гиперваскуляризация. NA_{ms} составляет 281 ± 96 и 394 ± 86 в 1 мм^2 соответственно, что на 22 и 79% выше контрольных значений. Количество МВ с признаками деструктивных изменений остается повышенным: Deg% через 140 и 170 суток составляет $4,74 \pm 0,43\%$ и $4,16 \pm 0,71\%$, что в 2,2–2,5 раза выше нормы. NA_{mf} и NA_{amf} через 140 суток снижаются относительно предыдущего срока (рис. 1). NA_{amf}/NA_{mf} остается пониженным. Через 170 суток только у одной собаки NA_{mf} остается повышенной на 16% ($p < 0,01$), значение коэффициента NA_{amf}/NA_{mf} нормализуется. Размерные характеристики МВ начинают расти, но не достигают значений интактного МН (таблица). J_{nuc} через 140 суток превышает контроль в 1,5 раза и нормализуется к концу опыта. Гистограммы распределения МВ по спектру калибров через 140–170 суток эксперимента практически идентичны. Бимодальность распределения сохраняется, первая мода сохраняет высокие значения (23% и 18%) и смещена относительно нормы в область более мелких проводников – 3,1–4,0 мкм. Основание гистограммы смещается на 1 разряд вправо и совпадает с основанием гистограммы интактного МН.

Таким образом, при экспериментальном моделировании и лечении высокоэнергетических оскольчатых переломов костей голени методом чрескостного остеосинтеза в МН обнаруживаются реактивно-деструктивные, компенсаторно-приспособительные и регенераторные реакции, направленные на поддержание гомеостаза. Наблюдаемые изменения клеточных и волокнистых компонентов периневрия аналогичны изменениям, описанным при дистракционном остеосинтезе у собак [5], но менее выражены, чем при «больших» удлинениях голени [2].

Динамика колебания численных плотностей нервных проводников свидетельствует о большей травматизации безмя-

котных волокон, численность которых в течение первых трех недель эксперимента снижается на 16–31%, что при незначительном (на 5–16%) возрастании суммарной площади пучков может быть связано не только с их топографическим перераспределением, но и с их реальной потерей. Численная плотность миелиновых проводников снижается только через неделю фиксации голени. В последующие сроки в МН обнаруживаются мелкие новообразованные волокна с тонкой миелиновой оболочкой и регенерационные кластеры. NA_{mf} и NA_{amf} и G начинают расти и достигают максимальных значений к 50-м суткам лечения, а затем снижаются и приближаются к контролю. Аналогичную динамику количества нервных проводников Suzuki A., Uemura T., Nakamura H. (2010) наблюдали в новообразованной кости при заживлении переломов – нервные волокна быстро восстанавливаются и увеличивают свою численность, а в последующий период реабилитации их численность постепенно нормализуется. G. Castaneda-Corral et al. (2011) установили, что иннервирующие кость сенсорные нервные волокна постоянно выделяют нейротрофический фактор GAP₄₃, участвующий в росте аксонов и регенерации нервов, что связывают с постоянной физиологической реконструкцией кости в течение жизни и необходимости обеспечения иннервации новообразованной кости, а при переломах выработка GAP₄₃ существенно возрастает. Следует отметить, что в нашем исследовании максимальный рост численности нервных проводников по времени совпадает со сроком консолидации перелома – от 42,0 до 50,0 суток эксперимента. Полученные результаты дают основание предположить, что периферические нервы могут играть важнейшую роль в процессах заживления перелома кости посредством арборизации нервных проводников и вырабатываемых ими нейромедиаторов.

Заключение

Полученные экспериментальные данные послужат теоретической основой поиска рациональных способов нейрометаболической фармакотерапии для оптимизации консолидации переломов и разработки эффективных методов реабилитации с целью предотвращения развития возможных осложнений неврологического характера и улучшения функции конечности.

Список литературы

1. Гайдышев И.П. Анализ и обработка данных: специальный справочник. – СПб.: Питер, 2001. – 752 с.
2. Особенности изменений нервов конечностей при «больших» удлиннениях по Илизарову в эксперименте / В.И. Шевцов, Н.А. Щудло, М.М. Щудло, И.В. Борисова // Известия Челябинского научного центра (УрО РАН). – 2004. – Специальный выпуск (25). – С. 28–33. [http://www.sci.urg.ac.ru/news/2001_4/\(соавт.\)](http://www.sci.urg.ac.ru/news/2001_4/(соавт.)).
3. Профилактика и лечение посттравматической нейропатии малоберцового нерва при чрескостном остеосинтезе переломов костей голени / О.В. Бейдик, С.И. Киреев, К.К. Левченко, Ю.В. Трошкин, С.В. Серпухов, Х.М.Ф. Сакала // Совр. техн. диагностики, лечения и реабилитации больных с забол. и повр. позвоночника, спинного мозга и периферической нервной системы: тезисы докл. Рос. конф. (Курган, 2005). – Курган. 2005. – С. 39–40.
4. Структурная реорганизация бедренной и большеберцовой артерий, малоберцового нерва и хряща коленного сустава при экспериментальных переломах костей голени у собак и их лечении методом чрескостного остеосинтеза / Н.А. Щудло, Т.Н. Варсегова, Т.А. Ступина, И.В. Борисова // Биомедицина. – 2012. – № 3. – С. 51–62.
5. Щудло М.М. Рост и дифференцировка структур эпиперинеурия в условиях дозированного растяжения // Вестник РАМН. – 2000. – № 2. – С. 19–23.
6. Aro H. Effect of nerve injury on fracture healing. Callus formation studied in the rat // Acta Orthop. Scand. – 1985. – Vol. 56, № 3. – P. 233–237.
7. García-Castellano J.M., Díaz-Herrera P., Morcuende J.A. Is bone a target-tissue for the nervous system? New advances on the understanding of their interactions // Iowa Orthop. J. – 2000. – № 20. – P. 49–58.
8. Neuropeptide Y innervation during fracture healing and remodeling. A study of angulated tibial fractures in the rat / H. Long, M. Ahmed, P. Ackermann, A. Stark, J. Li // Acta Orthop. – 2010. – Vol. 81, № 5. – P. 639–646.
9. Suzuki A., Uemura T., Nakamura H. Control of bone remodeling by nervous system. Neural involvement in fracture healing and bone regeneration // Clin. Calcium. – 2010. – Vol. 20, № 12. – P. 1820–1827.
10. The majority of myelinated and unmyelinated sensory nerve fibers that innervate bone express the tropomyosin receptor kinase A / G. Castaneda-Corral, J.M. Jimenez-Andrade, A.P. Bloom, R.N. Taylor, W.G. Mantyh, M.J. Kaczmarek, J.R. Ghilardi, P.W. Mantyh // Neuroscience. – 2011. – Vol. 31, № 178. – P. 196–207.