

STĘŻENIE LEPTYNY U MĘŻCZYŹN UZALEŻNIONYCH OD ALKOHOLU

Ewa Kopczyńska¹, Marcin Ziółkowski²

¹ Katedra i Zakład Patobiochemii i Chemii Klinicznej
Akademii Medycznej w Bydgoszczy

² Zakład Pielęgniarstwa Psychiatrycznego
Akademii Medycznej w Bydgoszczy

LEPTIN CONCENTRATION IN ALCOHOL DEPENDENT MALE PATIENTS

ABSTRACT – Leptin (LPT) is an adipocyte-secreted hormone, which regulates fat mass by decreasing appetite and food intake and increasing energy expenditure. Thus, an increase of serum leptin level could be an indicator of malnutrition. Probably, leptin stimulates immunocompetitive cells and increases their secretion activity of some proinflammatory cytokines.

The leptin secretion depends on many different factors, among other things alcohol. One of the probable reasons of postalcoholic hyperleptinemia is induction of necrotic factor, TNF-alpha, which increases both circulating leptin level and gene expression in the adipose tissue.

The aim of this study was to investigate whether a lack of appetite and caloric deficit in alcohol-dependent men are caused by an increased leptin level or by some other reason.

Sixty males with diagnosis of alcohol dependence were examined. The control group consisted of fourteen males without alcohol dependence, drinking alcohol occasionally. The investigated parameters were determined in the blood serum by means of immunoenzymatic assay.

As in general population, in alcohol dependent males, the leptin levels were positively correlated with BMI (body mass index).

There was no significant difference in the leptin level and LPT/BMI index between the alcoholic and control group. On the other hand, the compared groups differed in TNF-alpha level.

The level of TNF-alpha in the subgroup of patients with hyperleptinemia was higher than in the subgroup with normal leptin level. There was no inverse dependence. These results suggest that leptin induces TNF-alpha secretion.

Key words: alcohol dependence, leptin, necrotic factor TNF-alpha.

WSTĘP

Leptyna (LPT), produkt genu *Ob*, jest hormonem polipeptydowym, wydzielanym przez adypocyty. Miejscem docelowym dla działania leptyny jest ośrodkowy układ nerwowy, jednak receptory dla LPT znajdują się także w tkankach obwodowych. Leptyna stanowi ogniwo ujemnego sprzężenia zwrotnego między zapasami zgromadzonego w organizmie tłuszczu, a ośrodkiem sytości w mózgu. LPT łącząc się z receptorami w podwzgórzu i hamując syntezę neuropeptydu Y (NPY) prowadzi do zmniejszenia apetytu i zwiększenia zużycia energii, a więc jest sygnałem sytości (1, 2, 4, 7, 26).

Z alkoholizmem związane są niedobory żywieniowe. Duży odsetek osób uzależnionych od alkoholu, które trafiają do szpitala ma niedobory kaloryczne. Czy są one zależne od indukowanych alkoholem zmian w stężeniu krążącej leptyny? Z badań wynika, że przewlekłe picie etanolu ma wpływ na ogólnoustrojowy metabolizm poprzez stymulację wytwarzania w wątrobie i w tkance tłuszczowej cytokin i hormonów (w tym leptyny), które regulują wydatek energetyczny i mogą mieć sprawczą rolę w powstawaniu niedożywienia (14, 16, 17, 19, 20).

U osób uzależnionych od alkoholu stwierdza się zwiększone stężenie leptyny (11, 19). Patogeneza poalkoholowej hiperleptynemii nie jest znana (10, 24). Jest kilka prawdopodobnych mechanizmów jej występowania: 1) u osób uzależnionych od alkoholu stwierdza się zwiększone stężenie prozapalnych cytokin (m.in. TNF), które są potencjalnymi induktorami syntezy leptyny (27), 2) etanol powoduje w mózgu obniżenie poziomu neuropeptydu Y, który reguluje syntezę leptyny (25), 3) zwiększone stężenie leptyny u osób uzależnionych od alkoholu może wskazywać na zwiększoną wrażliwość tkanki tłuszczowej do uwalniania leptyny (19).

Celem badań było uzyskanie odpowiedzi na pytanie: czy ewentualnie występujący u osób uzależnionych od alkoholu deficyt kaloryczny może być spowodowany nasiloną syntezą leptyny.

OSOBY BADANE I METODY

Osoby badane

Do grupy badanej włączono 60 mężczyzn, w wieku od 22 do 59 lat, z rozpoznaniem uzależnienia od alkoholu. Czas trwania uzależnienia od alkoholu wynosił od 2 do 39 lat. Początek uzależnienia od alkoholu stwierdzono w wieku średnio 27 ± 8 lat. W ciągu 90 dni przed hospitalizacją pacjenci pili alkohol średnio przez $41,3 \pm 30$ dni (0-90). W tym czasie wypijali średnio $728,3 \pm 827$ standardowych drinków (0-3432). Badani byli hospitalizowani na Oddziale Leczenia Uzależnień przy Katedrze i Klinice Psychiatrii Akademii Medycznej w Bydgoszczy.

O włączeniu do grupy badanej zdecydowało: spełnienie kryteriów diagnostycznych uzależnienia od alkoholu wg ICD-10 (28), pisemna zgoda na uczestniczenie w

badaniach oraz aktywność enzymów wątrobowych nie przekraczająca 3-krotnej wartości górnej granicy zakresu wartości referencyjnych. Badania wykonywano w okresie aktywnego uzależnienia od alkoholu, tj. w momencie przyjęcia pacjenta do oddziału.

Grupę kontrolną stanowiło 14 mężczyzn w podobnym wieku, niezależnych od alkoholu, pijących alkohol okazjonalnie. Były to osoby zdrowe psychicznie i somatycznie, z prawidłowymi wynikami profilu wątrobowego i lipidowego.

Metody badań

Stężenie badanych związków (leptyny i TNF-alfa) oznaczano w surowicy krwi. Krew żylną w ilości około 2 ml pobierano do plastikowych probówek zawierających separator surowicy. Materiał pozostawiano w temperaturze pokojowej do całkowitego wykrzepnięcia. W celu uzyskania surowicy krew wirowano przy 400 g w czasie 10 minut. Surowicę przechowywano w zamrażarce, w temperaturze -20°C.

Stężenia leptyny i TNF-alfa oznaczano techniką ELISA za pomocą zestawów odczynnikowych odpowiednio firmy IBL i Bender MedSystems oraz czytnika mikropłytek Multiskan EX.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono stosując następujące metody: 1) test U Manna-Whitney'a do porównania niezależnych pomiarów, 2) współczynnik korelacji Spearmana w ocenie zależności pomiędzy wynikami badanych parametrów.

WYNIKI

U mężczyzn uzależnionych od alkoholu, podobnie jak w ogólnej populacji, występuje zależność pomiędzy stężeniem leptyny a wskaźnikiem BMI (wskaźnik masy ciała, ang. *body mass index*). U pacjentów z BMI większym od 23 kg/m² stwierdzono istotnie ($p < 0,001$) większe stężenie leptyny niż u osób z BMI ≤ 23 kg/m².

TABELA 1

Porównanie stężenia leptyny w podgrupach pacjentów uzależnionych od alkoholu różniących się wskaźnikiem BMI.

The comparison of leptin concentration in alcohol dependent patients subgroups with different BMI.

	Stężenie leptyny u pacjentów uzależnionych od alkoholu		Statystyczna istotność różnic*
	BMI ≤ 23 kg/m ² (n=33) x \pm SD	BMI > 23 kg/m ² (n=27) x \pm SD	
LPT (2,0 – 5,6 ng/ml)	2,55 \pm 0,78 ng/ml	4,18 \pm 2,10 ng/ml	IS ($p < 0,001$)

x – wartość średnia

SD – odchylenie standardowe

IS – różnica istotna statystycznie

NS – różnica nieistotna statystycznie

* – test U Manna-Whitney'a

Wartość graniczną stanowi średnia wartość BMI w badanej grupie, która wynosi $22,7 \pm 3,17 \text{ kg/m}^2$ (17,74-33,95).

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w stężeniu leptyny i we wskaźniku LPT/BMI pomiędzy grupą mężczyzn uzależnionych od alkoholu i grupą kontrolną, chociaż wyższe od wartości referencyjnych stężenie LPT odnotowano u 8,3 % pacjentów uzależnionych od alkoholu. Natomiast stężenie TNF-alfa różniło się istotnie ($p < 0,01$) między porównywanymi grupami i było oznaczalne (norma: $< 0 \text{ pg/ml}$) u 48,3 % pacjentów uzależnionych od alkoholu.

TABELA 2

Wyniki stężenia leptyny, TNF-alfa i wskaźnika LPT/BMI u uzależnionych od alkoholu w grupie kontrolnej.

Results of leptin and TNF-alpha concentrations and LPT/BMI index in alcohol dependent men and controls.

Parametr	Uzależnieni od alkoholu (n=60) x±SD (rozpiętość)	Nieuzależnieni od alkoholu (n=14) x±SD (rozpiętość)	Statystyczna istotność różnic
LPT (2,0 – 5,6 ng/ml)	3,40±2,41 (2,0-9,50)	3,76±1,44 (2,0-6,52)	n.z.
LPT(x100)/BMI (ng/ml / kg/m ²)	13,07±7,25 (0-39,3)	15,45±5,62 (7,87-25,87)	n.z.
TNF-alfa ($< 0 \text{ pg/ml}$)	9,30±14,03 (0,0-60,6)	0,0	($p < 0,01$)

W podgrupie pacjentów ze zwiększonym stężeniem leptyny stwierdzono istotnie większe stężenie TNF-alfa ($p < 0,02$) niż w podgrupie z prawidłowym stężeniem LPT.

TABELA 3

Porównanie stężenia TNF-alfa w podgrupach pacjentów uzależnionych od alkoholu z prawidłowym i podwyższonym stężeniem leptyny.

The comparison of TNF-alpha concentration in subgroups of alcohol dependent patients with normal and increased leptin concentration.

	Stężenie TNF-alfa u pacjentów uzależnionych od alkoholu		Statystyczna istotność różnic
	z prawidłowym stężeniem leptyny* (n=55)	ze zwiększonym stężeniem leptyny (n=5)	
TNF-alfa ($< 0 \text{ pg/ml}$)	7,93 ± 11,29 pg/ml	24,34 ± 29,59 pg/ml	($p < 0,02$)

* – wyniki stężenia leptyny w zakresie wartości referencyjnych (2,0 - 5,6 ng/ml)

Natomiast nie wykazano odwrotnej zależności; pomiędzy podgrupami pacjentów z nieznaczalnym i podwyższonym stężeniem TNF-alfa nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w stężeniu leptyny; nie różnił się istotnie także wskaźnik LPT/BMI, (choć oba parametry były większe w grupie z podwyższonym poziomem TNF-alfa).

TABELA 4

Porównanie stężenia leptyny i wskaźnika LPT/BMI w podgrupach pacjentów uzależnionych od alkoholu z nieoznaczalnym i podwyższonym stężeniem TNF-alfa.
The comparison of leptin concentration and LPT/BMI index in subgroups of alcohol dependent patients with impossible to determine and increased TNF-alpha concentration.

	Stężenie leptyny u pacjentów uzależnionych od alkoholu		Statystyczna istotność różnic
	z nieoznaczalnym stężeniem TNF-alfa (n=31)	ze zwiększonym stężeniem TNF-alfa (n=29)	
LPT (2,0-5,6 ng/ml)	3,27±1,43 ng/ml	3,54±2,06 ng/ml	n.z.
LPT(x100)/BMI (ng/ml/kg/m ²)	11,91±6,64 ng/ml/kg/m ²	14,30±7,77 ng/ml/kg/m ²	n.z.

Stosując korelację Spearmana nie wykazano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy badanymi parametrami (LPT i TNF-alfa), ani pomiędzy tymi parametrami a cechami klinicznymi, takimi jak: występowanie alkoholizmu w rodzinie, występowanie napadów drgawkowych, depresji, lub przebycie majaczenia alkoholowego.

W badanej grupie osób uzależnionych od alkoholu częstość palenia papierosów nie miała wpływu na stężenie leptyny.

DYSKUSJA

U pacjentów uzależnionych od alkoholu, u których stwierdza się niedobory kaloryczne, stężenie leptyny jest mniejsze niż u osób prawidłowo odżywionych (19). Potwierdzono to w badaniach własnych, u pacjentów z mniejszym wskaźnikiem masy ciała stwierdzono istotnie mniejsze stężenie leptyny niż u mężczyzn z dużym BMI (2,55±0,78 vs. 4,18±2,10 ng/ml).

Z danych z piśmiennictwa (11, 12, 13, 19) wynika, że zarówno stężenie leptyny jak i wskaźnik LPT/BMI, wyznaczony w celu wykluczenia zależności pomiędzy BMI i stężeniem LPT, u osób uzależnionych od alkoholu są większe niż w grupie kontrolnej. Natomiast w badaniach własnych nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu leptyny i w wielkości wskaźnika LPT/BMI pomiędzy grupą pacjentów uzależnionych od alkoholu i grupą osób zdrowych. Być może te rozbieżności są spowodowane różną ilością spożywanego przez badanych alkoholu: w badaniach własnych – średnio około 100 g/dziennie, a np. w badaniach Nicolas i wsp. (19) – 167 g/dziennie. Inną przyczyną jest być może różny czas trwania uzależnienia od alkoholu.

Są jednak także doniesienia (22) mówiące o tym, że u osób uzależnionych od alkoholu stężenie leptyny jest zmniejszone. Podobnie jest u osób zdrowych, przyjmowanie umiarkowanych ilości alkoholu hamuje sekrecję leptyny (21).

W badaniach własnych dokonano także oceny wzajemnych zależności pomiędzy leptyną i TNF-alfa. W podgrupie pacjentów ze zwiększonym stężeniem leptyny stwierdzono istotnie większe stężenie TNF-alfa niż w podgrupie z prawidłowym stężeniem LPT. Natomiast nie wykazano odwrotnej zależności; pomiędzy podgrupami pacjentów z nie-

oznaczalnym i zwiększonym stężeniem TNF-alfa nie stwierdzono różnicy w stężeniu leptyny; nie różnił się istotnie także wskaźnik LPT/BMI. Z powyższych zależności można wnioskować, że leptyna stymuluje wydzielanie TNF-alfa.

Istotnie (15, 23) leptyna uczestniczy w immunologicznej odpowiedzi zapalnej, a niedobór leptyny u myszy powoduje osłabienie syntezy hepatotoksycznych cytokin TNF-alfa i Il-18 (6).

Z kolei TNF-alfa syntetyzowany przez adypocyty, działając auto- i parakrynnie reguluje miejscową syntezę leptyny (27). TNF-alfa i inne cytokiny zwiększają zarówno stężenie krążącej leptyny, jak i ekspresję jej genu w tkance tłuszczowej. Mechanizm ten nie jest jednak jasny (5, 8, 9, 18).

WNIOSKI

1. U mężczyzn uzależnionych od alkoholu z mniejszym wskaźnikiem masy ciała stężenie leptyny jest mniejsze niż u pacjentów z wysokim BMI.
2. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w stężeniu leptyny pomiędzy grupą pacjentów uzależnionych od alkoholu a grupą kontrolną.
3. Uzyskane wyniki nie wskazują na to, aby spożycie alkoholu bezpośrednio wpływało na stężenie leptyny.

STRESZCZENIE

Wydzielana przez adypocyty leptyna (LPT) jest hormonem, który reguluje masę tkanki tłuszczowej poprzez zmniejszenie apetytu i przyjmowania pokarmu oraz zwiększenie zużycia energii. Zatem hiperleptynemii może być wskaźnikiem niedożywienia. Prawdopodobnie leptyna zwiększa aktywność sekrecyjną komórek immunokompetentnych w zakresie prozapalnych cytokin.

Na wydzielanie leptyny mają wpływ różne czynniki, m. in. alkohol. Jedną z prawdopodobnych przyczyn poalkoholowej hiperleptynemii jest indukcja czynnika nekrotycznego TNF-alfa, który z kolei zwiększa zarówno stężenie krążącej leptyny, jak i ekspresję jej genu w tkance tłuszczowej.

Celem pracy była odpowiedź na pytanie: czy brak apetytu i deficyt kaloryczny u osób uzależnionych od alkoholu jest spowodowany zwiększeniem stężenia leptyny, czy też przyczyna jest inna.

Badaniami objęto 60 mężczyzn, z rozpoznaniem uzależnienia od alkoholu. Grupę kontrolną stanowiło 14 mężczyzn nieuzależnionych od alkoholu, pijących alkohol okazjonalnie. Stężenia leptyny i TNF-alfa oznaczano w surowicy krwi techniką ELISA.

U mężczyzn uzależnionych od alkoholu, podobnie jak w ogólnej populacji, stężenie leptyny wykazuje dodatnią korelację z BMI.

Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w stężeniu leptyny i wielkości wskaźnika LPT/BMI pomiędzy grupą pacjentów uzależnionych od alkoholu a grupą kontrolną. Natomiast stężenie TNF-alfa różniło się istotnie między porównywanymi grupami.

W podgrupie pacjentów z hiperleptynemią, średnie stężenie TNF-alfa było istotnie większe niż w podgrupie z prawidłowym stężeniem LPT. Natomiast nie wykazano odwrotnej zależności. Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że leptyna stymuluje wydzielanie TNF-alfa.

Słowa kluczowe: uzależnienie od alkoholu, leptyna, czynnik nekrotyczny TNF-alfa.

PIŚMIENNICTWO

1. Bowles L., Kopelman P.: *Leptin: Of mice and men?* J. Clin. Pathol., 2001, 54, 1-3.
2. Bray G.A., York D.A.: *Leptin and clinical medicine. A new piece in the puzzle of obesity.* J. Clin. Endocrinol. Metabol., 1997, 82, 2771-76.
3. Cabre E., Gassull M.A.: *Nutritional aspects of liver disease and transplantation.* Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 2001, 4, 581-589.
4. Cambell R.E., Haffrench J.M., Cowley M.A., Smith M.S., Grove K.L.: *Hypothalamic circuitry of neuropeptide Y regulation of neuroendocrine function and food intake via the Y5 receptor subtype.* Neuroendocrinology, 2001, 74, 106-125.
5. Faggioni R., Fantuzzi G., Fuller J., Dinarello C.A., Feingold K.R., Grunfeld C.: *IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation.* Am. J. Physiol., 1998, 274, 204-208.
6. Faggioni R., Jones-Carson J., Reed D.A., Dinarello C. A., Feingold K.R., Grunfeld C., Fantuzzi G.: *Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis alpha and IL-18.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 2367-72.
7. Fried S.K., Ricci M.R., Russell C.D., LaFerrere B.: *Regulation of leptin production in humans.* J. Nutr., 2000, 130, 3127-31.
8. Grunfeld C., Pang M., Shigenaga J.K., Jensen P., Lallone R., Friedman J., Feingold K.R.: *Serum leptin levels in the acquired immunodeficiency syndrome.* J. Clin. Endocrinol. Metab., 1996, 81, 4342-46.
9. Grunfeld C., Zhao C., Fuller J., Pollack A., Moser A., Friedman J., Feingold K.R.: *Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters.* J. Clin. Invest., 1996, 97, 2152-57.
10. Hiney J.K., Dearth R.K., Lara F., Wood S., Srivastawa V., Les Dees W.: *Effects of ethanol on leptin secretion and the leptin-induced luteinizing hormone (LH) release from late juvenile female rats.* Alcohol. Clin. Exp. Res., 1999, 23, 1785-92.
11. Kiefer F., Jahn H., Jaschinski M., Holzbach R., Wolf H., Naber D., Wiedemann K.: *Leptin: a modulator of alcohol craving?* Biol. Psychiatry, 2001, 49, 782-787.
12. Kiefer F., Jahn H., Schick M., Wiedemann K.: *Alcohol intake, tumor necrosis factor-alpha, leptin and craving: factors of a possibly vicious circle?* Alcohol Alcohol., 2002, 37, 401-404.
13. Kiefer F., Jahn H., Wolf H., Kampf P., Knautd K., Wiedemann K.: *Free-choice alcohol consumption in mice after application of the appetite regulating peptide leptin.* Alcohol. Clin. Exp. Res., 2002, 25, 787-789.
14. Lin H.Z., Yang S.Q., Zeldin G., Diehl A.M.: *Chronic ethanol consumption induces the production of tumor necrosis factor-alpha and related cytokines in liver and adipose tissue.* Alcohol. Clin. Exp. Res., 1998, 22, 231-237.

15. Loffreda S., Yang S.Q., Lin H.Z., Karp C.L., Brengman M.L., Wang D.J., Klein A.S., Bulkeley G.B., Bao C., Noble P.W.: *Leptin regulates proinflammatory immune responses*. *FASEB J.*, 1998, 12, 57-65.
16. Mantzoros C.S.: *The role of leptin in human obesity and disease: A review of current evidence*. *Ann. Intern. Med.*, 1999, 130, 671-680.
17. Mantzoros C.S., Liolios A.D., Tritos N.A., Kaklamani V.G., Doulgerakis D.E., Griveas I., Moses A.C., Flier J.S.: *Circulating insulin concentrations, smoking, and alcohol intake are important independent predictors of leptin in young healthy men*. *Obes. Res.*, 1998, 6, 179-186.
18. Medina E. A., Stanhope K. L., Mizuno T. M., Mobbs C. V., Gregoire F., Hubbard N. E., Erickson K. L., Havel P. J.: *Effects of tumor necrosis factor alpha on leptin secretion and gene expression: relationship to changes of glucose metabolism in isolated rat adipocytes*. *Int. J. Obes.*, 1999, 23, 896-903.
19. Nicolas J. M., Fernandez-Sola J., Fatjo F., Casamitjana R., Bataller R., Sacanella E., Tobias E., Badia E., Estruch R.: *Increased circulating leptin levels in chronic alcoholism*. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2001, 25, 83-88.
20. Nunez N.P., Carter P.A., Meadows G.G.: *Alcohol consumption promotes body weight loss in melanoma-bearing mice*. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 2002, 26, 617-626.
21. Rojdmarm S., Calissendorff J., Brismar K.: *Alcohol ingestion decreases both diurnal and nocturnal secretion of leptin in healthy individuals*. *Clin. Endocrinol.*, 2001, 55, 639-647.
22. Santolaria F., Perez-Cejas A., Aleman M.R., Gonzales-Reimers E., Milena A., De La Vega M.J., Martinez-Riera A., Gomez-Rodriguez M.A.: *Low serum leptin levels and malnutrition in chronic alcohol misusers hospitalized by somatic complications*. *Alcohol Alcohol.*, 2003, 38, 60-66.
23. Santoz-Alvarez J., Goberna R., Sanchez-Margalet V.: *Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes*. *Cell. Immunol.*, 1999, 194, 6-11.
24. Strbak V., Benicky J., Macho L., Jezova D., Nikodemova M.: *Four-week ethanol intake decreases food intake and body weight but does not affect plasma leptin, corticosterone, and insulin levels in pubertal rats*. *Metabolism*, 1998, 47, 1269-73.
25. Thiele T.E., Marsh D.J., Marie L.S., Bernstein I.L., Palmiter R.D.: *Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels*. *Nature*, 1998, 396, 366-369.
26. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M.: *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature*, 1994, 372, 425-432.
27. Zumbach M.S., Boehme M.W.J., Wahl P., Stremmel W., Ziegler R., Nawroth P.P.: *Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997, 82, 4080-82.
28. *Klasyfikacja zaburzeń psychicznych i zaburzeń zachowania w ICD-10. Badawcze kryteria diagnostyczne*. Uniwersyteckie Wyd. Med. „Vesalius”. Instytut Psychiatrii i Neurologii, Kraków-Warszawa 1998, 55-68.