

## Gadolinium and fluorescent bi-functionally labeling and in vitro MR imaging of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

DUAN Xiao-hui<sup>1</sup>, SHEN Jun<sup>1\*</sup>, CHENG Li-na<sup>1</sup>, ZHONG Xiao-mei<sup>1</sup>, FU Yue<sup>2</sup>, LIANG Bi-ling<sup>1</sup>

(1. Department of Radiology, 2. Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] Objective To determine the feasibility of magnetical labeling and tracking rabbit mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro. Methods MSCs isolated from rabbit bone marrow were cultured and expanded. A bi-functional labeling reagent complex was obtained by the incubation linear polyethylenimine derivative (PEI-FluoR) with Gd-DTPA to label the MSCs bi-functionally. After labeling, the MSCs were examined under fluoroscope and electron microscope, and the biological characters were detected using trypan blue exclusion test, MTT and apoptosis detection. On a 1.5 Tesla MR system, the labeled MSCs were examined with spin echo T1WI, T2WI and T1-mapping measurement. The minimal amount of labeled MSCs that could be detected by MRI was determined. The labeling duration was determined in the labeled MSCs under routine passage. Results With the bi-functional agents, the efficacy of labeling MSCs was 80%. After labeling, red fluorescence was found in the cytoplasm of MSCs under fluorescence microscopy and higher density electron particles of gadolinium were found around cellular apparatuses under electron microscopy. There was no statistical difference of trypan blue excusion rate between labeled cells and unlabeled cells within 24 hours of incubation ( $F = 2.17 - 1.38, P > 0.05$ ), nor in the MTT proliferation test between labeled cells and unlabeled cells within 5 days after labeling ( $F = 1.93 - 0.61, P > 0.05$ ). The apoptosis index for labeled cells and unlabeled cells was 0.40% and 0.19%, respectively. The signal intensity on T1WI and T1 relaxation time of unlabeled cells and labeled cells were 2166 ~ 167 and (2445 ~ 21)ms, 3162 ~ 350 and (1404 ~ 129)ms, respectively ( $t = 6.91, 29.87, P < 0.005$ ). The minimal detectable amount of labeled cells was  $1 @ 10^4$ . After routine passage, MRI could detect labeled cells until the third passage. Conclusion The gadolinium and fluorescent bi-functionally labeling rabbit MSCs using the transfection agent of polyethylenimine is feasible, efficient and safe. The labeled cells can be tracked in vitro on MR imaging.

[Key words] Mesenchymal stem cells; Magnetic resonance imaging; Rabbits

## 兔骨髓间充质干细胞的 Gd-DTPA 标记及 MRI 体外示踪

段小慧<sup>1</sup>, 沈君<sup>1\*</sup>, 成丽娜<sup>1</sup>, 钟小梅<sup>1</sup>, 符岳<sup>2</sup>, 梁碧玲<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第二医院放射科, 2. 急诊科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的 探讨兔 MSCs 磁性标记及 MRI 体外示踪的可行性。方法 培养分离兔 MSCs, 以 PEI-FluoR 为载体, 体外对 MSCs 进行双标记。标记后行荧光镜、电镜观察及生物学性状检测。应用 1.5T MRI 仪, 对标记细胞进行 SE 序列 T1WI 及 T2WI 扫描及 T1-mapping 测量 T1 时间, 并观察 MRI 上能显示标记 MSCs 的最小数目及标记后正常传代后 MRI 监测的持久性。结果 MSCs 双标记后, 标记效率为 80%, 细胞内可见荧光物质, 电镜下 Gd 颗粒位于胞浆内。标记后 24 h 内标记细胞与未标记细胞间台盼蓝拒染率、标记后 5 d 内标记细胞与未标记细胞的 MTT 吸光度值差异无统计学意义。标记细胞凋亡指数为 0.40%, 未标记细胞为 0.19%。未标记及标记细胞 T1WI 平均信号强度及 T1 时间分别为 2166 ~ 167、(2445 ~ 21)ms, 3162 ~ 350、(1404 ~ 129)ms ( $t = 6.91, 29.87, P < 0.005$ )。体外 MRI 上可检测到最低  $1 @ 10^4$  个标记细胞, 并可持续显示第 3 代标记细胞。结论 应用多聚胺载体对兔 MSCs 进行 Gd-DTPA 及荧光双标记安全、有效; MRI 能示踪体外双标记的干细胞。

[基金项目] 国家自然科学基金(30400115), 广东省自然科学基金(04300241)。

[作者简介] 段小慧(1982-), 男, 湖南郴州人, 在读硕士。研究方向: 分子影像学与骨骼肌肉系统。E2mail: duanxiaohui-128@163.com

[通讯作者] 沈君, 中山大学附属第二医院放射科, 510120。E-mail: vencentjsj@tom.com

[收稿日期] 2008-07-21 [修回日期] 2008-10-11

[关键词] 间充质干细胞; 磁共振成像; 兔

[中图分类号] R445.2; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2009)01-0036-04

MRI 是干细胞监测及活体示踪的较为理想的手段<sup>[1-7]</sup>。由于铁的较强 T2<sup>\*</sup> 负性对比效应和生物可降解性, 铁类对比剂被广泛应用于细胞磁性标记及 MRI 活体示踪<sup>[1-5]</sup>。临床应用钆类对比剂的应用报道不多<sup>[6-7]</sup>。本研究对兔的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)进行双标记, 并在体外利用 MRI 检测标记的 MSCs, 探讨兔 MSCs Gd-荧光双标记方法的可行性及安全性。

## 1 材料与与方法

1.1 实验动物 2~3 个月龄健康新西兰大白兔 3 只, 体重 1~1.5 kg, 供取细胞使用。主要设备包括 CO<sub>2</sub> 培养箱(Heraeus 公司)、超净工作台、倒置相差显微镜(Nikon 公司)、荧光倒置显微镜(Nikon 公司)、流式细胞仪(BD 公司)、日立 H2600 透射电子显微镜、1.5T 磁共振成像系统(Intera, Philips 公司)和 Wellscan MK3 型自动分析酶标仪(Labsystems Dragon 公司)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 麻醉兔后, 穿刺抽取 2~4 ml 胫骨及股骨骨髓, 加入 3 ml 含 3000 单位肝素的培养基(不含血清)的离心管内, 离心、去上清, 用含 10% 血清的培养基重悬细胞, 1000 r/min 离心 5 min, 以 5 × 10<sup>5</sup>/ml 接种于培养瓶中, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 下培养, 48 h 后首次换液, 以后每 48~72 h 换液一次, 细胞铺满瓶底 80% 左右时按 1B<sup>-</sup> 传代, 多次换液传代逐渐纯化 MSCs。取第 4 代 MSCs, 加入标记有异硫氰酸荧光素的 CD29、CD45、CD44、CD34、CD166 抗体, 流式细胞仪测定细胞的免疫表型进行鉴定。

1.2.2 参照前期大鼠 MSCs 双标记的方法<sup>[7]</sup>, 将等容积的 0.5 mol/L 的 Gd-DTPA 及 JPEI-FluoR 加入 150 mmol/L 的 NaCl 中振荡混匀, 室温下孵育 15~30 min, 制成双能示踪剂。标记时 5 × 10<sup>5</sup> MSCs 直接加入双能示踪剂, 孵育 4 h 后, 去除培养液, PBS 液洗涤 3 次, 消化收集后行 MRI。取等量 MSCs, 仅加入 20 μl 的 Gd-DTPA, 不加 PEI-FluoR 作为对照组。

1.2.3 MRI 检测序列为 SE 序列: T1WI 和 T2WI。T1WI: TR/TE 为 500/20 ms, 层厚/层距为 1.5/0 mm, 信号采集次数(NSA)为 2 次; T2WI: TR/TE 为 2600/100 ms, 层厚/层距 1.5/0 mm, NSA 为 2 次。并使用 T1-Mapping 测量 T1 弛豫时间, T1-mapping 使用 SE 及反转恢复(IR)序列交替的混合(Mix)序列, SE 序列的 TR/TE 为 3500/20 ms, IR 序列 TR/TE 为 4000 ms/20 ms, TI: 400 ms, 8 个回波, NSA 为 1 次。在工作站上, 利用感兴趣技术测量细胞的信号强度以及 T1 弛豫时间。

1.2.4 分别取 10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、5 × 10<sup>3</sup>、10<sup>3</sup>

标记细胞, 收集于 1.5 ml EP 管中, 悬浮于 50 μl 4% 明胶, 4℃ 下凝固后, 放入盛有 37℃ 水的 EP 管盒内行 MRI。每个细胞数目设置等量对照组, 观察 MRI 所能示踪的最低的标记细胞密度。

取 10<sup>6</sup> 第 3 代的 MSCs, 标记后正常传代, 每传一代分别取 5 × 10<sup>5</sup> 子代细胞, 收集于 EP 管内, 进行 MRI 检测。了解随着细胞的增殖分裂, Gd 标记的持久性。正常传代的未标记 MSCs 作为对照。

1.2.5 活力测定采用台盼蓝拒染试验, 5 × 10<sup>5</sup> MSCs 标记后继续培养, 6 h、12 h、24 h 后分别消化离心, 滴加等量 0.4% 台盼蓝染液, 显微镜下计数总细胞数和着色细胞数, 细胞存活率 = [(总细胞数 - 着色细胞数) / 总细胞数] × 100%。取同等数量的未标记细胞作为对照。

采用 MTT 法测定增殖能力, MSCs 标记后以每孔 10<sup>4</sup> 数目接种于 96 孔培养板中, 于第 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 后的 5 个时间点上进行检测, 每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl, 孵育 4 h, 吸弃孔内上清液, 每孔加入 150 μl 二甲亚砜, 振荡 10 min 后 492 nm 波长下酶联免疫检测仪检测各孔吸光度。取同等数量未标记 MSCs 为对照组。

凋亡检测采用 Annexin/碘化吡啶(PI)双染色法, 5 × 10<sup>5</sup> 标记及未标记 MSCs, 冷 PBS 洗涤 3 次, 200 μl 结合缓冲液重悬细胞, 加 Annexin V-FITC 10 μl 及 PI 5 μl, 室温避光反应 15 min, 冷 PBS 洗涤 1 遍, 加 300 μl 结合缓冲液重悬细胞后, 于流式细胞仪上检测, 以 Annexin<sup>+</sup> / PI<sup>-</sup> 判断为早期凋亡, Annexin<sup>+</sup> / PI<sup>+</sup> 判断为晚期凋亡或死亡。

1.2.6 5 × 10<sup>5</sup> 标记后的 MSCs, 荧光显微镜下观察细胞内有无荧光。另取 5 × 10<sup>5</sup> 标记 MSCs, 20 g/L 多聚甲醛 + 25 g/L 戊二醛 4℃ 前固定 20 min, 离心 10 min 后弃上清继续前固定 30 min, 后固定 40 min, 梯度酒精脱水, 环氧树脂 Epon8.2 包埋, LKB-工型超薄切片机制片, 醋酸双氧铀和枸橼酸铅双染色, 透射电镜观察细胞内有无高电子密度的 Gd 颗粒。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析。计量资料数据使用  $\bar{x} \pm s$  表示, t 检验比较标记与未标记细胞

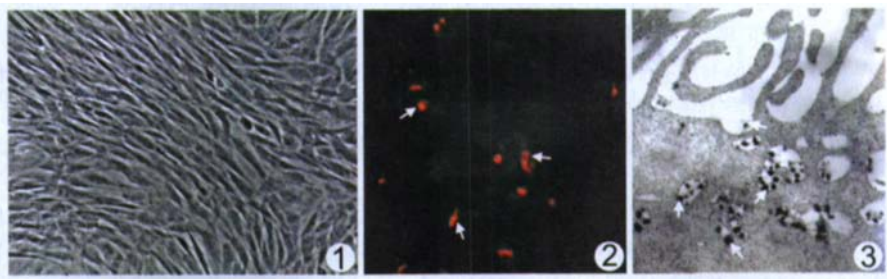


图 1 MSCs 的分离培养 相差显微镜下 P4 代 MSCs 细胞形态一致, 呈漩涡状排列(×200)  
图 2 双标记细胞荧光镜下观察 MSCs 标记后, 荧光镜下可见细胞内较多罗丹明的红色荧光(箭)(×200)  
图 3 双标记细胞电镜观察 标记 MSCs 内存在大量致密的 Gd 颗粒, 位于细胞浆内(箭)(×15000)

T1WI 信号强度、T1 弛豫时间, 方差分析比较最小细胞密度及持久性检测、台盼蓝拒染率、MTT 吸光度, 组内比较采取 LSD 检验。检验水准为  $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 1 原代细胞培养 24 h 后, 可见稀疏的折光较强的细胞贴壁生长, 10~14 d 后细胞达 80%~90% 融合, 呈漩涡样生长。至 3~4 代时, 细胞形态一致, 呈成纤维细胞样(图 1)。免疫表型鉴定显示 CD29、CD44、CD166 阳性, CD34、CD45 阴性。

2.2 MSCs 双标记后, 荧光镜下细胞胞质内可见较多红色荧光(图 2), 经流式细胞仪检测, 标记率为 80%。电镜下细胞浆内可见较多高电子密度颗粒, 围绕细胞器分布(图 3)。

2.3 双标记 MSCs 细胞 T1WI 表现为高信号, T2WI 信号减低。未标记与标记细胞 T1WI 信号强度分别为: 2.66 ± 0.167, 3.62 ± 0.350, T1 时间分别为: (2445 ± 21) ms, (1404 ± 129) ms。标记细胞较未标记细胞 T1WI 信号强度增加 45.98%, T1 时间缩短约 42.58% (图 4), 二者间差异均具有统计学意义 ( $t = 6.91, 29.87, P < 0.05$ )。

不同数目标记与未标记 MSCs T1WI 信号强度及 T1 时间值见表 1。随着细胞数目的减少, T1WI 上信号强度也逐渐减少(图 5), 肉眼下观察, T1WI 上 5 @10<sup>3</sup> 标记细胞及未标记细胞的信号强度无明显差别。10<sup>5</sup>、5 @10<sup>4</sup>、10<sup>4</sup> MSCs 标记与未标记细胞间的 T1WI 信号强度及 T1 时间差异均有统计学意义 ( $q = 16.05 \sim 5.95, P < 0.05; q = 20.59 \sim 9.18, P < 0.05$ ), 而 5 @10<sup>3</sup>、10<sup>3</sup> 标记细胞未标记细胞差异无统计学意义 ( $q = 2.63, 1.11, P > 0.05; q = 3.26, 1.16, P > 0.05$ )。

不同数目标记与未标记 MSCs T1WI 信号强度及 T1 时间值见表 1。随着细胞数目的减少, T1WI 上信号强度也逐渐减少(图 5), 肉眼下观察, T1WI 上 5 @10<sup>3</sup> 标记细胞及未标记细胞的信号强度无明显差别。10<sup>5</sup>、5 @10<sup>4</sup>、10<sup>4</sup> MSCs 标记与未标记细胞间的 T1WI 信号强度及 T1 时间差异均有统计学意义 ( $q = 16.05 \sim 5.95, P < 0.05; q = 20.59 \sim 9.18, P < 0.05$ ), 而 5 @10<sup>3</sup>、10<sup>3</sup> 标记细胞未标记细胞差异无统计学意义 ( $q = 2.63, 1.11, P > 0.05; q = 3.26, 1.16, P > 0.05$ )。

标记与未标记 MSCs 正常传代后, 各代细胞 T1WI 信号强度、T1 时间见表 2。标记细胞随着传代, 其 T1WI 信号强度逐渐减低(图 6), 标记及未标记 MSCs 的第 1、2 代细胞的 T1WI 信号强度及 T1 时间均有统计学差异 ( $q = 8.41, 3.79, P < 0.05; q = 8.5, 4.31, P < 0.05$ ), 而第 3 代细胞两者差异均无统计学意义 ( $q = 0.44, P > 0.05; q = 0.59, P > 0.05$ )。肉眼下观察标记细胞传代至 3 代时与未标记细胞的信号强度无明显差别。

2.4 台盼蓝拒染实验中, 标记后 24 h 内, 标记与未标记 MSCs 台盼蓝拒染率差异无统计学意义 ( $F = 2.17 \sim 1.38, P > 0.05$ )。MTT 增殖活力测定中, 标记组及未标记组 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 各时间点上标记与未标记细胞的吸光度值差异无统计学意义 ( $F = 1.93 \sim 0.61, P > 0.05$ )。Annexin/PI 双染色法凋亡率检测, 标记细胞的凋亡率为 0.40%, 未标记细胞为 0.19%, 二者无明显差别(图 7)。

表 1 标记细胞与未标记细胞 T1WI 信号强度及 T1 时间

参数	MSCs	细胞数目(个)				
		10 <sup>5</sup>	5 @10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	5 @10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
T1WI 信号强度	标记细胞	2368 ~ 115	2034 ~ 121	1667 ~ 143	1537 ~ 144	1406 ~ 107
	未标记细胞	1685 ~ 83	1569 ~ 81	1441 ~ 48	1391 ~ 66	1361 ~ 100
T1 时间(ms)	标记细胞	2039 ~ 71	2355 ~ 65	2402 ~ 79	2514 ~ 109	2557 ~ 86
	未标记细胞	2834 ~ 142	2791 ~ 98	2754 ~ 137	2648 ~ 128	2581 ~ 68

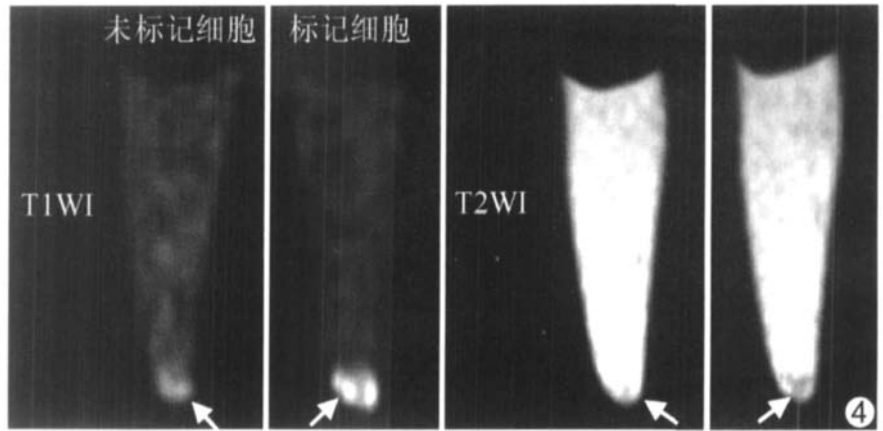


图 4 双标记细胞的 MRI 体外成像 标记 MSCs 在 T1WI 上由于 Gd 的正性增强作用其信号较未标记的 MSC 高(箭), 相应的 T2WI 上信号减低(箭)

表 2 正常传代的标记细胞与未标记细胞 T1WI 信号强度及 T1 时间

参数	MSCs	MSCs 正常传代		
		第 1 代	第 2 代	第 3 代
T1WI 信号强度	标记细胞	2423 ~ 305	1725 ~ 268	1030 ~ 122
	未标记细胞	1462 ~ 255	1329 ~ 302	987 ~ 210
T1 时间(ms)	标记细胞	1205 ~ 107	1450 ~ 98	1899 ~ 180
	未标记细胞	1680 ~ 231	1742 ~ 201	1941 ~ 264

3 讨论

为了解移植细胞在体内的存活、分布、迁移及增殖、分化, 可采用 Fe 类或 Gd 类对比剂对 MSCs 细胞进行标记, 利用 MRI 进行活体水平的示踪<sup>[1-7]</sup>。Fe 类对比剂因其粒径小及弛豫率强, 可参与细胞内铁的正常代谢且可利用普鲁士蓝染色进行验证而被广泛应用<sup>[1-5]</sup>, 但也存在一定的问题, 如标记后的干细胞为较低信号, 移植时, 如采取局灶性注射, 无法与带入的气泡和针道的低信号相区别, 同时由于 T2\* WI 放大效应, 依据信号强度改变会造成对实际移植入的干细胞数量产生过高估计<sup>[8-9]</sup>。Gd 类对比剂一定程度上可弥补这些不足。Modo 等<sup>[6]</sup>利用 Gd-DTPA、葡聚糖、Rhodamine 合成了标记物 GRID, 标记的干细胞既可为 MRI 所检测, 也能因 Rhodamine 在荧光显微镜下被观测而实现组织学验证, 但此双能对比剂需要在实验室自行合成。笔者前期使用 Gd-DTPA 及 PEI-FluoR 成功的双标记了大鼠 MSCs, 标记的干细胞能同时被荧光镜及 MRI 检测<sup>[7]</sup>。由于所用的对比剂及载体均已商品化, 不需实验室合成, 相对 GRID 而言具有进一步普及应用的优势。

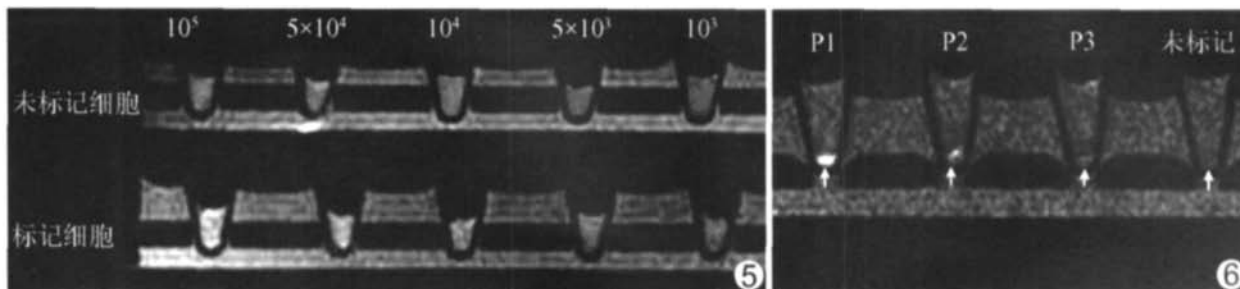


图 5 体外 MRI 检测标记细胞的效率 T1WI 上,  $10^5$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $10^4$  标记 MSCs 信号较同等数量为标记细胞信号高, 而  $5 \times 10^3$  及  $10^3$  标记 MSC 的信号强度与对照组信号无明显差异 图 6 MSCs 标记持久性的 MRI 检测  $10^6$  细胞标记后, 随着细胞的正常传代, T1WI 显示细胞的信号强度逐渐减低, 至第 3 代时, 其信号强度与未标记细胞相似(箭)。P1、P2、P3: 分别为标记后正常传代的第 1、2、3 代细胞

目前有部分研究单位采用高场强专用型磁共振成像系统在大鼠脑、肝脏、肾脏、脾脏等较大器官上成功进行 MSCs 移植的活体 MRI 示踪, 但国内高场强专用型 MRI 仪数量有限。故使用临床应用型成像系统针对较大体型的动物开展干细胞移植研究显得非常必要<sup>[9]</sup>。兔体型相对较大, 动物模型制作较方便, 在 1.5T 磁共振仪上使用直径较小的表面线圈可对兔较细小结构如坐骨神经等进行成像<sup>[10]</sup>。本研究在前期对大鼠 MSCs 的研究基础上成功分离培养了兔骨髓 MSCs, 利用 Gd-DTPA 与 PEI-Fluor 成功地对干细胞进行双标记, 标记的 MSCs 能同时被荧光镜及 MRI 检测, 标记后细胞活力、增殖力及凋亡未受影响, 体外 MRI 能显示最低密度为  $1 \times 10^4$  的标记细胞, 且随着细胞的分裂, MRI 可持续显示传代至 3 代(约 12~15 d)的标记细胞, 提示 Gd-DTPA 双标记方法在活体示踪兔 MSCs 移植后迁徙、归位中亦具有较好的应用前景。

[参考文献]

[1] Wang P, Wang JH, Yan ZP, et al. In vivo MR imaging of nanometer magnetically labeled bone marrow stromal cells transplanted via portal vein in rat liver. Chin J Radiol, 2006, 40(2): 133-138.  
王平, 王建华, 颜志平, 等. 超顺磁性氧化铁标记大鼠骨髓基质细胞经门静脉移植 MRI 活体示踪的研究. 中华放射学杂志, 2006, 40(2): 133-138.

[2] Sun JH, Teng GJ, Ju SH, et al. MR imaging of implanted magnetically labeled rat bone marrow mesenchymal stem cells in normal kidney. Chin J Med Imaging Technol, 2006, 22(2): 205-208.  
孙军辉, 滕皋军, 居胜红, 等. 磁标记大鼠肾脏骨髓间充质干细胞移植 MR 成像研究. 中国医学影像技术, 2006, 22(2): 205-208.

[3] Zheng MW, Huan Y, Xu J, et al. In vitro MR imaging of superparamagnetic iron oxide labeled mesenchymal stem cells. Chin J Med Imaging Technol, 2006, 22(8): 1129-1134.  
郑敏文, 宦怡, 徐健, 等. 超顺磁性氧化铁标记骨髓间充质干细胞的磁共振成像研究. 中国医学影像技术, 2006, 22(8): 1129-1134.

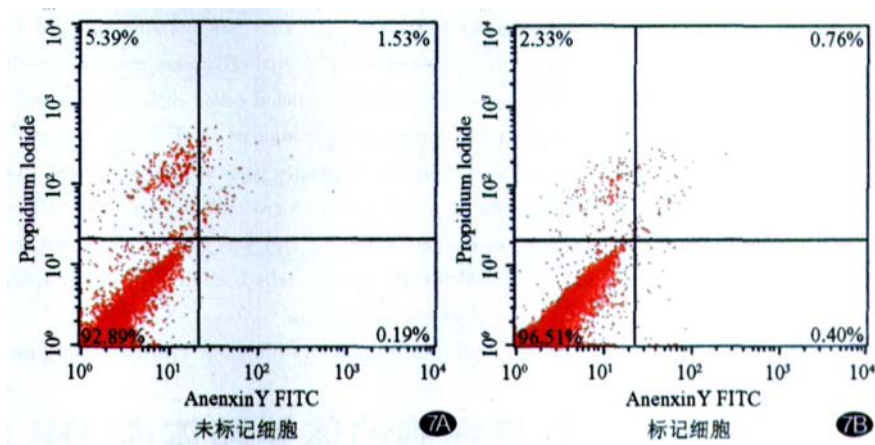


图 7 标记细胞 Annexin V/PI 双染色法细胞凋亡分析 未标记细胞(A)及标记细胞(B)的流式细胞仪分析显示凋亡率分别为 0.19%、0.40% (右下象限数值)

[4] Hoehn M, Kustermann E, Blunk J, et al. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(25): 16267-16272.

[5] Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, et al. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. Blood, 2004, 104(4): 1217-1223.

[6] Modo M, Cash D, Mellodew K, et al. Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. Neuroimage, 2002, 17(2): 803-811.

[7] Shen J, Zhou CP, Cheng LN, et al. Gadolinium and fluorescent bifunctionally labeling and in vitro MR imaging of rat bone marrow mesenchymal stem cells. Chin J Radiol, 2008, 42(4): 426-431.  
沈君, 周翠屏, 成丽娜, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的钆-荧光双标记及 MRI 体外示踪的研究. 中华放射学杂志, 2008, 42(4): 426-431.

[8] Cunningham CH, Arai T, Yang PC, et al. Positive contrast magnetic resonance imaging of cells labeled with magnetic nanoparticles. MRM, 2005, 53(5): 999-1005.

[9] Pintaske J, Martirosian P, Clausen CD, et al. Positive contrast in the detection of magnetically labeled cells by MRI)) in vitro experiments. Biomed Tech (Berl), 2005, 50(9): 271-276.

[10] Shen J, Wang HQ, Zhou CP, et al. Magnetic resonance microneurography of rabbit sciatic nerve on a 1.5-T clinical MR system correlated with gross anatomy. Microsurgery, 2008, 28(1): 32-36.