

УДК 598.2:577.115.3

ЗМІНИ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ ЛІПІДІВ У ТКАНИНАХ РІЗНИХ ОРГАНІВ КУЛИКІВ У ПЕРЕДМІГРАЦІЙНИЙ ПЕРІОД

І.О. Ликова

Харківський національний педагогічний університет імені Г.С. Сковороди

Ключові слова: кулики, жирнокислотний склад ліпідів, ω -3 ненасичені жирні кислоти.

Changes in fatty acid composition of lipids in tissues of different organs of waders in the pre-migration period. – I.A. Lykova. Kharkiv National Pedagogical University named after G.S. Skovoroda.

*The paper presents results of studies of fatty acid composition of lipids in tissues of different organs of two wader species *Calidris alpina* (L.) and *C. minuta* (Leisl.). It was established that fatty acid composition in tissues of the studied bird species changes depending on their degree of fatness and does not depend on direction of their migration. Quantity of fatty acids (FA) in common lipids of the studied tissues increases at the expense of unsaturated FA. The more degree of fatness results in the higher unsaturation coefficient of FA. In the pre-migration period the content of polyene FA increases in fatty acid composition of common lipids of the studied tissues. With growth of bird body mass in fatty acid composition of pectoral muscles substantially increases the content of ω -3 unsaturated FA which serve as molecular signals for muscles during extreme loads in long-distance flights.*

Key words: waders, fatty acid composition of lipids, ω -3 unsaturated fatty acids

Изменения жирнокислотного состава липидов в тканях различных органов куликов в предмиграционный период. – И.А. Лыкова. Харьковский национальный педагогический университет имени Г.С. Сковороды.

*В статье представлены результаты исследований жирнокислотного состава липидов в тканях различных органов двух видов куликов (*Calidris**



alpina (L.) и *C. minuta (Leisl.)*. Установлено, что жирнокислотный состав общих липидов в тканях у исследуемых видов птиц изменяется в зависимости от изменения степени их жирности и не зависит от направления миграции. Количество жирных кислот (ЖК) в общих липидах исследуемых тканей повышается за счет ненасыщенных ЖК. С увеличением степени жирности птиц увеличивается коэффициент ненасыщенности ЖК. В премиграционный период в жирнокислотном составе общих липидов исследуемых тканей повышается содержание полиеновых ЖК. С увеличением массы тела у птиц в жирнокислотном спектре липидов в грудных мышцах существенно увеличивается содержание ω -3 ненасыщенных ЖК, которые служат для мышц молекулярными сигналами при экстремальных нагрузках во время длительных перелетов.

Ключевые слова: кулики, жирнокислотный состав липидов, ω -3 ненасыщенные жирные кислоты.

Міграція – процес, який викликає низку фізіологічних перетворень в організмі птахів. Сигналом до початку цих змін слугує фотоперіодизм і коливання температури навколишнього середовища. Ці сигнали передаються і обробляються в гіпоталамусі, який стимулює секрецію гормонів гіпофіза. Гормони гіпофіза змінюють добові ритми роботи печінки, викликають гіперфагію, відкладання жиру, міграційну поведінку, що супроводжується створенням зграй і активізують механізми біонавігації. Таким чином, виникає міграційний стан у птахів (Ильичев, 1982).

Характерною особливістю птахів-мігрантів у передміграційний період є гіперфагія. Птахи в цей період споживають багато корму, значно більше ніж це необхідно для задоволення енергетичних затрат. Надлишок поживних речовин, які запасуються у вигляді жиру, є енергетичним депо організму, що використовується під час тривалих безпосадкових перельотів.

Енергетичні резерви запасуються організмом птахів у вигляді глікогену і жиру, значення яких суттєво змінюється протягом річного циклу життєдіяльності. Органічні речовини в енергетичному обміні організму взаємозамінні, але існують винятки. Так, для нервової тканини і головного мозку єдиним джерелом енергії є глюкоза. Більшість інших органів в якості джерела енергії, окрім вуглеводів, використовують жирні кислоти. Особливе значення жири мають для м'язової тканини, тому в передміграційний період у птахів загальний вуглеводний метаболізм змінюється на жировий. У міграційний період жири становлять основу енергетичних запасів організму, досягаючи 40 % маси тіла, тоді, як запаси глікогену – лише 0.5-2.5%. У м'язах перелітних птахів жиру у 10 разів більше, ніж глікогену, та у значній кількості міститься фермент ліпаза (Ильичев, 1982).

У далеких мігрантів скорочення м'язів відбувається за рахунок енергії, яка утворюється при окисненні жирних кислот (ЖК), які потрапляють з позаклітинних жирових запасів і переходять в мітохондрії м'язів. Транспортну функцію при цьому виконує спеціальний білок, який зв'язує жирні кислоти. Вміст у м'язових клітинах цього білка корелює з властивістю жирних кислот до окиснення (Pelsers at all., 1999). Таким чином, співвідношення між синтезом ЖК у печінці, їх акумуляцією в жировій тканині і окисненням в мітохондріях м'язів – важливі показники фізіологічного стану далеких мігрантів.

Кулики – одна з модельних груп птахів для вивчення адаптацій під час міграцій, оскільки багато представників цієї групи є далекими мігрантами. Метою наших досліджень було дослідити загальний вміст ліпідів і їх жирнокислотний склад у печінці, жировій і м'язовій тканинах у птахів з різним ступенем жирності на прикладі далеких мігрантів – побережника чорногрудого (*Calidris alpina* (L.)) і побережника малого (*Calidris minuta* (Leisl.)) на проміжній зупинці (Азово-Чорноморський регіон) при перельоті з місць зимівель на місця гніздування і навпаки.

Матеріал і методи дослідження

Матеріал зібраний навесні 2011 р. в околицях м. Джанкої АР Крим на р. Победна, на Центральному і Східному Сивашу. У літній період матеріал зібраний в Якимівському районі Запорізької області, поблизу с. Давидівка, на р. Великий Утлюк. Для дослідження було відібрано 18 зразків грудних м'язів, абдомінального жиру і печінки побережників чорногрудого і малого.

Досліджених птахів зважували на терезах "Pesola" і оцінювали кількість їхніх жирових резервів (Блюменталь, Дольник, 1962). Після розтину відбирали зразки грудних м'язів, абдомінального жиру та печінки і заморозували за $t = -18\text{C}^{\circ}$.

На базі Інституту тваринництва НААНУ (м. Харків) було проведено визначення загального вмісту жиру у відібраних зразках тканин за загальноприйнятою методикою. Загальні ліпіди з тканин птахів екстрагували сумішшю хлороформу та метанолу у співвідношенні 2:1 (Folch, 1957). Для визначення вмісту окремих жирних кислот загальні ліпіди омилювали та отримані жирні кислоти метилювали (Рівіс та ін., 1997). Для визначення концентрації окремих ненасичених жирних кислот (НЕЖК) ліпіди відокремлювали від хлороформу та отримані жирні кислоти метилювали (Рівіс та ін., 1997). Отримані метилові ефіри вищих жирних кислот (ВЖК) загальних ліпідів і фракції НЕЖК розділяли методом газорідинної хроматографії. Для досліджень метилових ефірів жирних кислот використовували газорідинний хроматограф "Chrom-5" (Чехія). При визначенні вмісту окремих ВЖК загальних ліпідів і фракції НЕЖК користувалися коефіцієнтами перерахунку, які отримували, використовуючи метод внутрішнього нормування. Отримані числові дані опрацьовані статистично за допомогою стандартного пакету статистичних програм Microsoft EXCEL.

Результати досліджень

На основі попередніх досліджень деяких видів куликів нами встановлено, що в м'язовій тканині вміст ліпідів і їх жирнокислотний склад не залежать від напрямку міграції, а залежать від стадії міграційного циклу і ступеня жирності птахів (Ликова, Харченко, 2011).

На момент збору матеріалу птахи мали різний ступінь жирності (табл. 1). Навесні нами були відібрані зразки тканин у побережника чорногрудого, птахи мали середній ступінь жирності та деякий час уже використовували кормові території. Особини побережника малого щойно прилетіли до регіону і мали низький ступінь жирності. Під час осінньої міграції були відібрані проби у чорногрудих побережників, які щойно прилетіли до регіону і майже не мали жирових відкладень, а особини побережника малого на момент збору матеріалу певний час використовували кормові території і мали високий ступінь жирності (табл. 1).



Таблиця 1. Середня вага тіла (g) і ступінь жирності досліджених птахів.

Table 1. Mean body mass (g) and degree of fatness in the studied birds.

Вид Species	Ступінь жирності Degree of fatness		Маса тіла (г) Body mass (g)	
	Весна Spring	Осінь Autumn	Весна Spring	Осінь Autumn
	<i>Calidris alpina</i> .	+	—	45.3 ± 1.69 n=7
<i>Calidris minuta</i>	~	X	22.2 ± 1.76 n=3	27.2 ± 1.05 n=3

Примітки: «—» - жирові відкладення відсутні, «~» - мало жирових відкладень, «+» - середня кількість жирових відкладень, «X» - багато жирових відкладень.

Notes: «—» - no fat deposits, «~» - small amount of fat deposits, «+» - average amount of fat deposits, «X» - large amount of fat deposits.

На основі отриманих даних ми підтвердили, що вміст загальних ліпідів у тканинах досліджуваних видів залежить від ступеня жирності птахів і не залежить від напрямку міграції. Найменші коливання вмісту загальних ліпідів ми виявили в абдомінальному жирі: у побережника малого від 40.51% до 68.25%, у побережника чорногрудого від 29.20% до 66.05%. Отже, вміст загальних ліпідів в абдомінальному жирі збільшується в 1.7-2.2 рази за період тимчасових зупинок під час міграції (табл. 2).

Таблиця 2. Вміст ліпідів в органах (%) та жирнокислотний склад (мг/100 мг натуральної речовини; %) загальних ліпідів тканин *C. alpina* і *C. minuta*.

Table 2. Contents of lipids in organs (%) and fatty acid composition (mg/100 mg of natural substance; %) of common lipids in tissues of *C. alpina* and *C. minuta*.

Вид / Species		<i>Calidris alpina</i> L.				<i>Calidris minuta</i> L.			
		L		H		L		H	
		мг/100 мг mg/100 mg	%	мг/100 мг mg/100 mg	%	мг/100 мг mg/100 mg	%	мг/100 мг mg/100 mg	%
Печінка Liver n=3	Ліпіди / Lipids (%)	1.96		8.71		2.86		8.31	
	Насичені ЖК Saturated FA	0.144±0.012	38.1	0.137±0.018	14.1	0.437±0.032	27.7	1.122±0.052	29.9
	Ненаси- чені ЖК Unsatu- rated FA	0.160±0.028	42.8	0.524±0.026	53.8	0.48±0.029	30.4	1.68±0.071	44.7
	ω-3	0.02±0.005	~**	0.05±0.008	~**	0.05±0.008	41.9	0.045±0.008	25.4
	ω-6	0.05±0.008	19.1	0.31±0.017	32.1	0.61±0.037	41.9	0.91±0.047	25.4
Всього: / Total:		0.374±0.053	100	0.973±0.051	100	1.577±0.082	100	3.757±0.113	100
Грудний м'яз Pectoral muscle n=3	Ліпіди / Lipids (%)	1.38		9.71		4.12		7.29	
	Насичені ЖК Saturated FA	0.125±0.023	43.7	0.674±0.068	32.7	0.315±0.021	41.7	0.908±0.062	34.7
	Ненаси- чені ЖК Unsatu- rated FA	0.101±0.019	35.3	0.895±0.087	43.5	0.310±0.020	41.0	1.09±0.067	41.7
	ω-3	~	~	0.02±0.005	~	~	~	0.01±0.002	~
	ω-6	0.06±0.008	21.0	0.39±0.028	23.8	0.13±0.009	17.3	0.52±0.039	23.6
Всього: / Total:		0.286±0.012	100	2.059±0.062	100	0.755±0.024	100	2.615±0.079	100
Абдо- мінальний жир Abdomi- nal fat n=3	Ліпіди / Lipids (%)	29.20		66.05		40.51		68.25	
	Насичені ЖК Saturated FA	1.038±0.063	35.7	1.584±0.081	30.2	0.907±0.065	34.4	3.113±0.118	33.7
	Ненаси- чені ЖК Unsatu- rated FA	1.43±0.074	49.2	2.82±0.137	53.7	1.380±0.087	52.3	4.71±0.231	51.1
	ω-3	~	~	0.27±0.014	~	~	~	0.40±0.029	~
	ω-6	0.44±0.021	15.1	0.572±0.044	16.1	0.35±0.022	13.3	1.00±0.057	15.2
Всього: / Total:		2.908±0.247	100	5.246±0.261	100	2.637±0.082	100	9.223±0.266	100

Примітки: L - птахи з низьким ступенем жирності; H - птахи з високим ступенем жирності; «~» - в слідових кількостях.

Note: L - birds with low degree of fatness; H - birds with high degree of fatness; «~» - in trace amounts.

Вміст загальних ліпідів у печінці коливається від 1.96-2.86% у птахів з низьким ступенем жирності до 8.31-8.71% у птахів з високим ступенем жирності. Таким чином, вміст загальних ліпідів у печінці збільшується в 2.9-4.4 рази за період тимчасової зупинки під час міграцій (табл. 2).

Найбільші коливання вмісту загальних ліпідів ми відмітили в грудних м'язах: від 4.12% до 7.29% у побережника малого; від 1.38 до 9.71% у побережника чорногрудого. Вміст загальних ліпідів у грудних м'язах збільшується в 1.8-7.0 рази за період тимчасових зупинок під час міграцій. Отже, наші дослідження підтверджують, що в передміграційний період у тканинах далеких мігрантів підвищується рівень загальних ліпідів, особливо в грудних м'язах.

Результати досліджень жирнокислотного спектру загальних ліпідів у тканинах досліджуваних птахів показали, що рівень насичених ЖК (НЖК) і ненасичених ЖК (НЕЖК) змінюється залежно від ступеня жирності птахів і не залежить від напрямку міграції (табл. 2).

Загальновідомо, що НЕЖК входять до складу фосфоліпідів тваринних тканин і є важливим фактором регуляції проникності біологічних мембран (впливають на поверхневі властивості фосфоліпідів, білок-ліпідні і ліпід-ліпідні взаємодії) і функціонування мембранних ферментів (Богач та ін., 1981). Активність мембранних ферментів визначається змінами в ліпідному складі фосфоліпідів. Збільшення вмісту НЖК в фосфоліпідах мембран знижує їх проникність, а за збільшення НЕЖК, зростає рідинність біомембран, що може впливати на обмінні процеси (Кучеренко, Васильев, 1985). Таким чином, зміни в жирнокислотному спектрі ліпідів у різних тканинах птахів

можуть впливати на їхній фізіологічний стан, що особливо характерно для далеких мігрантів.

Результати досліджень показали, що співвідношення НЖК і НЕЖК в печінці досліджуваних птахів залежить від ступеня жирності птахів і не залежить від напрямку міграції. Вміст НЖК в печінці птахів з низьким ступенем жирності становить 30-38% від загальної кількості ЖК і зменшується у птахів, які мають велику кількість жирових запасів до 27-14% (рис. 1).

Вміст НЕЖК, навпаки, позитивно корелює зі ступенем жирності птахів і становить 62% – 85% від загальної кількості ліпідів, в основному за рахунок збільшення моноєнових ЖК.

Важливим показником фізіологічного стану птахів є співвідношення в складі ліпідів тканин моноєнових і полієнових НЕЖК, особливо для жирової тканини і грудних м'язів. Жирова тканина є резервом ЖК, які накопичуються в ній протягом передміграційного

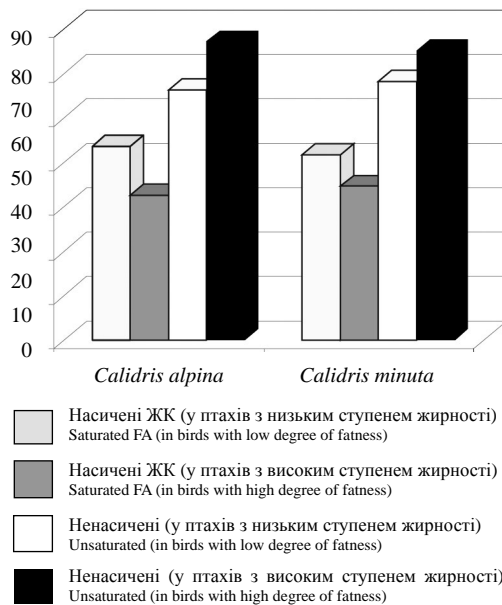


Рис. 1. Вміст ЖК у печінці *C. alpina* і *C. minuta* в залежності від ступеня жирності птахів (%).

Fig. 1. FA content in liver of *C. alpina* and *C. minuta* in relation to degree of bird fatness (%).

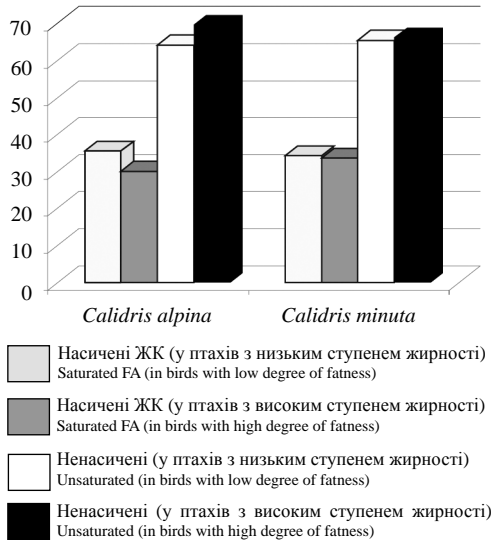


Рис. 2. Вміст ЖК в абдомінальному жири *C. alpina* і *C. minuta* в залежності від ступеня жирності птахів (%).

Fig. 2. FA content in abdominal fat of *C. alpina* and *C. minuta* in relation to degree of bird fatness (%).

абдомінальному жири вищий у птахів з високим ступенем жирності (до 53.7%). Рівень полієнових ЖК позитивно корелює зі ступенем жирності птахів. У птахів, які майже не мали жирових відкладень їх вміст становив 13.3%, а у птахів, які мали високий ступінь жирності їх вміст підвищувався до 16.1% (табл. 2).

Встановлено, що у птахів з високим ступенем жирності в жирнокислотному спектрі полієнових ЖК збільшується кількість ω -6 НЕЖК за рахунок підвищення рівня арахідонової кислоти ($C_{20:4}$), яка слугує попередником ейкозаноїдів – сигнальних речовин, які утворюються в клітинах організму і зумовлюють низку важливих процесів у різних тканинах. Одними із найважливіших ейкозаноїдів є простагландини і тромбоксани, які зумовлюють процеси скорочення м'язової тканини, збільшують кровообіг у м'язах (Казимирко, Мальцев, 2004).

У птахів з високим ступенем жирності в жирнокислотному спектрі ліпідів абдомінального жиру з відбувається ростання рівня ω -3 полієнових НЕЖК, які, як і ω -6 НЕЖК, не синтезуються організмом, а потрапляють з їжею (Кучеренко, Васильєв, 1985). В абдомінальному жири птахів, у яких жирові запаси були майже відсутні, ω -3 НЕЖК виявлені в слідових кількостях, а у птахів з високим ступенем жирності їх вміст становив 3.2-4.3% від загального рівня ЖК. Це свідчить про те, що за час перебування на зупинках досліджені види побережників використовують корми, багаті на полієнові НЕЖК.

Подібні коливання кількості НЖК і НЕЖК у досліджуваних видів птахів ми виявили і в жирнокислотному спектрі ліпідів грудних м'язів. Нами встановлено, що рівень НЖК і НЕЖК в ліпідах грудних м'язів залежить від ступеня жирності птахів (рис. 3).

періоду в результаті гіперфагії і потім мобілізуються із жирових депо під час міграції. Відомо, що схема мобілізації ЖК із жирових резервів не залежить від сезону міграції, а змінюється лише їх кількісний склад (Price at all., 2008).

Наші дослідження також підтвердили, що кількісний вміст НЖК і НЕЖК у жировій тканині не залежить від напрямку міграції, а залежить від ступеня жирності птахів і загального рівня ліпідів у тканині. Рівень НЖК у жирнокислотному спектрі абдомінального жиру коливається від 30.2% до 35.7% і зменшується зі збільшенням жирових відкладень у птахів (рис. 2).

Найбільшу частку в жирнокислотному спектрі абдомінального жиру становлять моноєнові НЕЖК (49.2-53.7%). Ці ЖК є попередниками незамінних полієнових ЖК, які використовуються в структурних ліпідах м'язів і інших тканинах органів. За результатами наших досліджень, рівень моноєнових ЖК в

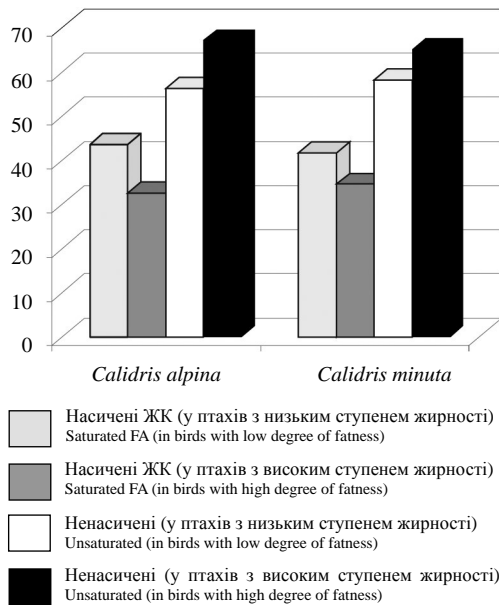


Рис. 3. Вміст ЖК у грудних м'язах *C. alpina* і *C. minuta* в залежності від ступеня жирності птахів (%).

Fig. 3. FA content in pectoral muscles of *C. alpina* and *C. minuta* in relation to degree of bird fatness (%).

які мали низький ступінь жирності, ω -3 НЕЖК були виявлені в слідових кількостях, а у птахів, які мали велику кількість жирових відкладень, їх вміст підвищувався до 0.40-0.99% від загальної кількості ЖК, що в 4 рази менше, ніж вміст ω -3 НЕЖК в абдомінальному жирі досліджуваних птахів.

Висновки

Установлено, що найвищий вміст ліпідів у досліджуваних тканинах має абдомінальний жир. Вміст загальних ліпідів у жировій тканині залежить від ступеня жирності птаха і коливається від 29.2% у птахів, які майже не мають жирових відкладень, до 68.25% у птахів, які мають високий ступінь жирності.

Найбільші коливання вмісту ліпідів в передміграційний період нами виявлено в грудних м'язах досліджуваних птахів. Вміст ліпідів у цій тканині за період проміжних зупинок підвищується майже в 7 разів.

Жиринокислотний склад ліпідів досліджуваних тканин змінюється залежно від ступеня жирності птахів і не залежить від напрямку міграцій. Кількість ЖК в ліпідах підвищується в усіх досліджуваних тканинах за рахунок підвищення вмісту НЕЖК.

Установлено, що зі збільшенням ступеня жирності птахів збільшується коефіцієнт ненасиченості ЖК. У птахів з низьким ступенем жирності коефіцієнт співвідношення НЕЖК/НЖК становить 1.3-1.6, а у птахів з високим ступенем жирності

Вміст НЖК грудних м'язів у досліджуваних птахів знижується зі збільшенням ступеня жирності птахів і коливається від 32.7% до 43.7%, тоді, як рівень НЕЖК зі збільшенням жирових відкладень у птахів підвищується до 56.3% від загальної кількості ЖК. Вміст моноєнових ЖК позитивно корелює зі ступенем жирності птахів і збільшується від 35.3% до 43.5%.

Паралельно з підвищенням рівня моноєнових ЖК, нами виявлено і збільшення рівня полієнових ЖК до 17.3-23.8% від загальної кількості ЖК. Особливо важливим, на нашу думку, є збільшення в жиринокислотному спектрі грудних м'язів рівня ω -3 НЕЖК, які підвищують окисні і гліколітичні властивості ферментів льотних м'язів. ω -3 НЕЖК впливають на енергетичний метаболізм у льотних м'язах через зміни в мембранних структурах і системних механізмах, тобто ці ЖК використовуються як молекулярні сигнали грудним м'язам для екстремальних навантажень у далеких мігрантів (Maillet, Weber, 2009). У птахів,



1.9-2.61, що свідчить про підвищення метаболічних процесів у передміграційний період.

Рівень полієнових ЖК в тканинах досліджуваних видів птахів підвищується залежно від тривалості проміжних зупинок і ступеня жирності. У птахів з високим ступенем жирності вміст полієнових ЖК в печінці збільшується в 1.7 разів, в грудних м'язах і абдомінальному жири – в 1.3 рази.

З'ясовано, що у передміграційний період зі збільшенням маси тіла у птахів у грудних м'язах та жировій тканині суттєво збільшується рівень ω -3 НЕЖК, які використовуються грудними м'язами як молекулярні сигнали для екстремальних навантажень під час дальніх перельотів. У птахів з низьким ступенем жирності ω -3 НЕЖК виявлені в слідових кількостях, а у птахів з високим ступенем жирності їх вміст підвищувався в грудних м'язах до 0.99%, в абдомінальному жири – до 4.3% від загальної кількості ЖК.

Література

- Блюменталь Т.И., Дольник В.Р. Оценка энергетических показателей птиц в полевых условиях // Орнитология. – М: МГУ, 1962. – №4. – С. 394–407.
- Богач П.Г., Курский М.Д., Кучеренко Н.Е., Рыбальченко В.К. Структура и функция биологических мембран. – Киев: Вища шк., 1981. – 336 с.
- Ильичев В.Д., Карташев Н.Н., Шилов И.А. Общая орнитология. – М.: Высшая школа, 1982. – 464 с.
- Казимирко В.К., Мальцев В.И. Функция ненасыщенных жирных кислот в организме // Новости медицины. – 2004. – №95. – С. 35–39.
- Кучеренко Н.Е., Васильев А.Н. Липиды. – К.: Вища шк., 1985. – 247 с.
- Ликова І.О., Харченко Л.П. Сезонні коливання жирнокислотного складу ліпідів м'язової тканини деяких видів куликів // Біологія та валеологія. Зб. наук. праць. – 2011. – Вип. 13. – С.38–43.
- Рівіс Й.Ф., Скорохід І.В., Данилик Б.Б., Процик Я.М. Одночасне газохроматографічне визначення окремих етерифікованих і неетерифікованих високомолекулярних кислот у біологічному матеріалі // Укр. біохім. журн. – 1997. – Т. 69. – № 2. – С. 110–115.
- Folch J., Less M., Sloane-Stanley A.G.H. // J. Biol. Chem. – 1957. – V. 226. – P. 497–509.
- Maillet D., Weber J.M. Relationship between n-3 PUFA content and energy metabolism in the flight muscles of a migrating shorebird: Evidence for natural doping // Anat. Rec.: Adv. Integr. Anat. and Evol. Biol. – 2009. – № 11. – V. 292. – P. 413–420.
- Pelsers M.M.A.L., Butler P. J., Bishop C. M., Glatz J. F.C. Fatty acid binding protein in heart and skeletal muscles of the migratory barnacle goose throughout development // Amer. J. Physiol. – 1999. – N 3. – V. 276. – P. 637–643.
- Price E. R., Krokfors A., Guglielmo Ch. G. Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue in migratory birds // J. Exp. Biol. – 2008. – № 1. – V.211. – P. 29–34.