

过氧化物酶体增殖物激活受体激动剂在心肌梗死中的作用机制研究进展

魏士雄 孙赫

(吉林大学白求恩第一医院胸心外科, 吉林 长春 130000)

【摘要】 过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARs) 属于核激素受体家族的一员, 是一类由配体激活的转录因子, 包括 PPAR α 、PPAR β/δ 和 PPAR γ 三种亚型。PPARs 已被证实具有调节血糖水平、脂质稳态、炎症发展和机体发育在内的多种功能, 且能够在不同的组织和细胞中特异性表达。既往研究已明确 PPARs 激动剂在治疗糖尿病和高脂血症中的重大作用, 近来 PPARs 配体作为心血管疾病治疗靶点的潜在价值也引起了学者们的广泛关注。现综述 PPARs 激动剂对心肌梗死情况影响的基础和临床研究进展, 并对未来进一步的深入研究方向提出设想。

【关键词】 过氧化物酶体增殖物激活受体; 心肌梗死; 血管生成; 心肌细胞

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.12.013

Action Mechanism of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonist in Myocardial Infarction

WEI Shixiong, SUN He

(Department of Cardiothoracic Surgery, The First Bethune Hospital of Jilin University, Changchun 130000, Jilin, China)

【Abstract】 Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) belong to nuclear hormone receptor family. They are ligand-activated transcription factors and exist in three isoforms, PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ . PPARs regulate a variety of functions, including glucose and lipid homeostasis, inflammation, and body development. They exhibit tissue and cell type-specific expression patterns and functions. Besides the established notion of the therapeutic potential of PPAR agonists for the treatment of glucose and lipid disorders, more recent data proposed specific PPARs ligands as potential therapies for cardiovascular diseases. Here we review the basic and clinical research results of the effects of PPARs agonists on myocardial infarction, and proposes ideas for further in-depth research in the future.

【Key words】 Peroxisome proliferator-activated receptor; Myocardial infarction; Angiogenesis; Cardiomyocytes

1 背景

急性心肌梗死具有高致死率, 以冠状动脉血流减少及氧供不足等为特点, 导致了以心脏缺血为特征的临床表现。其常见危险因素包括肥胖、血脂异常和糖尿病等。目前世界范围内每年新增超过 300 万例患者。过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 激动剂被广泛用于单独或联合治疗多种代谢疾病, 如糖尿病和高脂血症等, 其属于核受体超家族配体激活的转录因子, 具有 PPAR α 、PPAR β/δ 和 PPAR γ 三种亚型, 能够被脂肪酸及其衍生物激活, 并与代谢过程直接关联。PPAR α 主要表达于肝脏、心脏、棕色脂肪组织和肾脏等部位, PPAR β/δ 的表达存在较强的物种差异性, 而 PPAR γ

则可在脂肪组织、心脏、胃肠道和免疫细胞中被检测到。人工合成的特异性激动剂可用于各型 PPARs 的激活, 并与顺式作用 DNA 元件和 PPAR 反应元件结合, 从而引起基因转录的上调^[1]。研究证实人类 PPARs 的基因多态性与动脉粥样硬化的发生发展密切相关, 可导致冠心病的发生发展, 并与其多个危险因素, 如 2 型糖尿病、高血压、肥胖、血脂异常和代谢综合征有关。因此 PPARs 基因多态性不仅直接参与了冠心病发生发展的多个环节, 而且可通过增加冠心病的危险因素来进一步促进冠心病的发生与发展。研究表明应用 PPARs 激动剂在治疗心血管疾病方面具有一定的作用, 但同时也产生不良影响, 从而限制了目前其在心血管风险患者中的应用程度。现综述 PPARs 激动

基金项目: 军委后勤保障部卫生局面上项目 (16BJZ28)

通信作者: 孙赫, E-mail: 773691039@qq.com

剂对心肌梗死情况产生影响的基础和临床研究进展,并对未来进一步的深入研究方向提出设想。

2 PPARs 激动剂在治疗心肌梗死中的应用

2.1 PPAR α 激动剂

目前各项研究中常见的 PPARs 广谱激动剂包括氯贝特、苯扎贝特、非诺贝特和血管紧张素 II 受体阻滞剂(替米沙坦等)等,而常见的 PPAR α 激动剂则包括吉非罗齐和 GW7647 等。20 世纪 80 年代末, Huttunen 等^[2]的一项研究提示 PPAR α 激动剂吉非罗齐可用于预防冠心病,在这项研究中,吉非罗齐在五年的试验期内成功降低了高胆固醇血症患者的血浆低密度脂蛋白水平,实现了对中年男性冠心病的一级预防作用,受试者冠心病的发病率降低 34%。1998 年 Goldenberg 等^[3]开启了一项苯扎贝特(一种降脂贝特酸衍生物,具有广泛的 PPARs 激动作用)预防心肌梗死的临床研究,8 年随访结果表明研究组的主要不良心脏事件减少了 17%。1999 年 Ginsberg 等^[4]开展了 ACCORD 研究,旨在探究与单独应用他汀类药物相比,联合应用他汀类药物和非诺贝特能否更加显著地降低 2 型糖尿病患者的心血管疾病风险,结果表明联合用药并未降低致死性心血管事件、非致死性心肌梗死或卒中的发生率。

2002 年 Wayman 等^[5]首次进行了 PPAR α 激动剂对心肌梗死预后影响的研究,他们在对实验对象进行诱导性心肌梗死后给予了氯贝特,同时还研究了 PPAR γ 激动剂噻唑烷二酮和环戊酮前列腺素对心肌梗死面积的影响。研究人员首先对大鼠使用了不同的 PPARs 激动剂药物,而后进行缺血再灌注处理,再测量大鼠的心肌梗死面积,其中氯贝特能够将梗死面积缩小 30%, WY14643 (Pirinixic acid, PPAR α 激动剂)则能够将梗死面积缩小 44%。研究发现噻唑烷二酮、罗格列酮和环格列酮对梗死面积的缩小作用较为显著(约 45%),而接受吡格列酮治疗的实验对象的梗死面积仅缩小 25%。进一步的研究表明,当实验对象接受环戊酮前列腺素治疗时,梗死面积的缩小情况最为显著——15D-PGJ2 (15-deoxy- Δ -12, 14-prostaglandin J2, 一种环戊烯酮前列腺素和 PGD2 的代谢产物,选择性 PPAR γ 激动剂)治疗组梗死面积缩小 85%, PGA1 组梗死面积缩小 47%。研究人员提出抑制激活 B 细胞的转录因子 κ -轻链增强子可能是 PPAR α 或 PPAR γ 激动剂预处理后机体获得心脏保护作用的一种机制,因为他们观察到心肌梗死后包括单核细胞趋化蛋白-1 和诱导型一氧化氮合酶等在内的核因子 κ B (NF- κ B) 促炎靶基因表达的上调,而这一情况在 15D-PGJ2 预处理后则会减弱。此外,15D-PGJ2 还上调了心脏保护

血红素氧合酶-1 的表达。然而,研究也表明尽管 15D-PGJ2 已被证实是一种有效的 PPAR γ 激动剂,但并不是所有观察到的效应都是通过 PPAR γ 介导的。一项针对大鼠心肌细胞体外研究的结果表明,PPAR γ 激动剂罗格列酮不具备如同 15D-PGJ2 上调血红素氧合酶-1 表达的能力。因此研究人员认为 15D-PGJ2 的增益效应也可能是由 PPAR α 受体的同时激活介导的^[5]。Yue 等^[6]也观察到类似的情况,他们在一个小鼠心肌缺血再灌注模型中评估了 PPAR α 激动剂 GW7647 的效果,结果 GW7647 显著缩小了梗死面积的大小,减轻了心肌收缩功能障碍。但这些效应在 PPAR α 基因被敲除的小鼠中并未被观察到,这证实了激动剂对于 PPAR α 受体的选择性。研究进一步表明, GW7647 能够降低心肌脂肪酸氧化酶的活性,阻止促炎细胞因子释放及中性粒细胞积累,抑制 NF- κ B 激活,这些结果进一步表明了 PPAR α 在心脏保护中具有代谢和抗炎特性。

但是, Sambandam 等^[7]在一项研究中却观察到了一组完全相反的结果。研究人员对野生型小鼠、心脏特异性过表达 PPAR α 小鼠和 PPAR α 敲除小鼠进行了心肌缺血再灌注处理。结果表明基因敲除小鼠比其他两组动物的心肌损伤面积更小,心功能受损程度更低,而过表达的小鼠则表现出葡萄糖氧化率低以及心肌收缩功能较差的情况。这表明持续性 PPAR α 激活对缺血后心肌细胞的功能恢复有不利影响^[8-9]。这一结论也被 Xu 等^[10]证实,他们的研究表明,PPAR α 过表达会对反复心肌缺血再灌注的小鼠心脏引起不可逆转的损伤,包括糖原沉积变多、细胞凋亡增加、抗氧化能力紊乱和收缩元件功能不良,并最终引起心室收缩功能下降^[8]。一项名为 FIELD 研究的结果表明,在纳入的 9 795 例 2 型糖尿病患者中,非诺贝特并未显著降低冠状动脉主要不良事件的风险,但降低了包括非致命性心肌梗死和血管再扩张在内的总体心血管不良事件^[9]。研究人员观察到接受 WY14643 治疗的 Goto-Kakizaki 大鼠缺血心肌的梗死面积缩小,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 和内皮型一氧化氮合酶的表达上调^[11]。在非糖尿病性心肌梗死并使用氯贝特治疗的大鼠中也观察到类似的发现。对炎症因子水平进行分析发现大鼠的白介素-6、肿瘤坏死因子- α 、细胞间黏附分子-1、血管细胞黏附分子-1、基质金属蛋白酶-9、NF- κ B 和诱导型一氧化氮合酶的表达降低。超声心动图检查显示,氯贝特降低了左心室扩张程度,但左室射血分数并未得到改善^[12]。

PPAR α 激动剂作为心脏脂肪酸氧化酶的激活剂和葡萄糖利用的抑制剂,被作为探索预防和治疗心肌

梗死的潜在药物而获得重视,但在部分研究中其副作用限制了这种发展。由于不同研究的配体依赖性变异、实验设置差异、给药时间和所用物种存在的差异可能限制了结论的普适性,因而 PPAR α 在心肌梗死模型中的具体作用尚不得知。

2.2 PPAR β/δ 激动剂

目前在研究的 PPAR β/δ 激动剂包括 GW501516 和 GW610742X 等。PPAR β/δ 主要表达于心肌组织,其缺失已被证明可诱导心肌脂质积累和心肌病,进而导致充血性心力衰竭及降低患者生存率,维持正常脂肪氧化已被证实是 PPAR β/δ 保护心肌作用的主要机制^[13]。PPAR β/δ 激动剂 GW501516 于 2000 年被应用于治疗代谢综合征和糖尿病,这些试验在 2007 年由于在动物实验中出现癌症副作用而停止^[13]。目前一项针对血管紧张素 II 受体阻滞剂替米沙坦(具有广谱 PPARs 激动作用)的两项临床试验已经完成(TRANSCEND 和 ONTARGET),研究结果表明除女性患者的心肌梗死总体风险降低 20% 外,两组在其余事件终点方面未见显著差异^[14]。

Wagner 等^[15]观察到 PPAR β/δ 激活对心肌梗死存在有益影响,在使用心肌细胞特异性过表达 PPAR β/δ 诱导的小鼠模型时,结果表明心肌梗死面积更小、细胞增殖增强以及心脏功能参数改善。另有学者研究了激动剂 GW610742X 对大鼠心肌梗死预后的影响^[16]。研究中左室射血分数未得到改善,也未降低磷酸肌酸/三磷酸腺苷比值或左心室重量及梗死大小。但 GW610742X 在心肌梗死标志物正常化、改善右心室肥厚和减少肺充血方面有一定帮助。据报道远端缺血预处理缩小心肌梗死面积和心肌细胞凋亡,改善心肌缺血后心脏的功能。预缺血这些有益的功能其分子信号通路或与 PPAR β/δ 的上调有关。有研究发现 PPAR β/δ 激动剂治疗能够诱导心肌的再血管化。在特异性过表达 PPAR β/δ 的小鼠中,研究人员不仅观察到心脏血管化的快速增加,而且还有心肌细胞的快速生长。并且 PPAR β/δ 血管特异性过表达也增加了心肌梗死患者的毛细血管密度。这些结果部分证实了心脏细胞中 PPAR β/δ 激活的适当平衡可能具有潜在的心脏保护作用,并强调了 PPAR β/δ 表达对心脏修复的意义。

然而,在实验中同样也发现,虽然血管生成增加,但未能改善这些心肌缺血动物的预后。并且有研究观察到,与对照组相比,诱导血管特异性 PPAR β/δ 过表达的动物的梗死面积更大,纤维化增强,超声心动图参数明显更差。这表明 PPAR β/δ 仅在血管系统中的特异性、不平衡激活不足以保护慢性缺血性心脏

病^[16]。据报道,在大鼠心肌梗死后使用 PPAR β/δ 激动剂 GW610742 治疗同样会增加血管密度和纤维化。GW610742 增加了骨髓源性间充质干细胞在心脏中的募集,并增强了成纤维细胞向肌成纤维细胞的分化。研究表明这一过程伴随着血清血小板源性生长因子 B、基质源性生长因子-1 和基质金属蛋白酶-9 水平的升高^[17]。目前针对 PPAR β/δ 激动剂的研究少于 PPAR α 和 PPAR γ 激动剂,它对于心血管系统的功能也比后者更为矛盾化,其在心血管系统中的具体功能有待探究,距离临床应用仍较为遥远。

2.3 PPAR γ 激动剂

常见的 PPAR γ 激动剂为噻唑烷二酮类药物(如罗格列酮、吡格列酮和曲格列酮等),临床上多用于治疗 2 型糖尿病,然而其因潜在的心脏副作用而饱受争议^[18]。在一项纳入了同时患有 2 型糖尿病及心血管疾病患者的前瞻性研究中,吡格列酮被证明增加了心力衰竭的发生率^[19]。与此同时,罗格列酮也被证明与心肌梗死和脑卒中发病率的升高相关^[20]。美国心脏协会和美国心脏病学会基金会的一项研究最终得出结论:噻唑烷二酮类药物无法预期从缺血性心脏病事件中获益^[21]。Doney 等^[22]调查了糖尿病患者的 PPAR γ 变异,他们发现 PPARG Pro12Ala 的变异与心肌梗死风险降低之间存在关联,而 C1431T 基因型则有相反的作用,以上多态性可能导致了上述相互矛盾的结果,其具体机制目前仍未知。

实验室的结果却发现:当使用罗格列酮治疗经缺血再灌注操作的大鼠模型时,研究人员观察到心肌梗死面积缩小,心肌收缩功能得到改善,巨噬细胞/中性粒细胞侵袭减少,这与细胞间黏附分子-1 和单核细胞趋化蛋白-1 表达降低相关。他们将这一心脏保护作用归因于抑制炎症反应^[23]。在另一研究中,作者发现经 PPAR γ 激动剂治疗的动物心脏中血管紧张素 II 受体的 ATR₁ 表达减少,ATR₂ 表达增加,同时这一过程伴随着丝裂原激活蛋白激酶 42/44 的下调,表明 ATR₂ 血管紧张素 II 对丝裂原激活蛋白激酶 42/44 的抑制是罗格列酮心脏保护作用的机制之一^[24]。罗格列酮对大鼠心肌梗死后左室重塑和收缩障碍也有一定的有益疗效^[25]。

在缺血再灌注前用吡格列酮预处理 7 d 的家兔中,研究人员观察到家兔的心肌梗死面积缩小,左心室功能得到改善,PI3K/Akt 和内皮型一氧化氮合酶通路被显著激活^[26]。Zhang 等^[27]还提出了 PI3K/Akt 通路的激活作为罗格列酮介导的缺血再灌注小鼠心脏保护的可能机制假设。此外,在大鼠心肌梗死模型中注射间充质干细胞后同时给予吡格列酮治疗比单纯

间充质干细胞移植能更有效地改善心功能。血管紧张素 II 受体阻滞剂替米沙坦也是一种以 PPAR γ 为靶点的药物,已在异丙肾上腺素诱导心肌损伤的实验模型中进行了评估,它降低了左心室舒张期末压,改善了生化、组织病理学和超微结构参数^[28]。这组研究人员还报道了替米沙坦对异丙肾上腺素诱导心肌损伤的糖尿病大鼠有类似的有益作用,这一过程可被 PPAR γ 拮抗剂 GW9662 抵消^[29]。

由于莫格他唑等药物引起的血清肌酸酐升高、体重增加、水肿的重大心血管不良事件等副作用^[30],这类双重 PPAR α/γ 激动剂的几项临床试验被停止。总之,虽然 PPAR γ 激动剂在糖尿病和动脉粥样硬化的治疗中有一定益处,但已知的危险因素与心血管疾病相关,它们也有着不利的影响,因此其临床应用仍然较为受限。

3 结论

各类 PPARs 激动剂有着互不相同的临床益处和不良事件,其能够控制脂质和能量代谢,因而在治疗心血管疾病中具有一定作用。但由于其在特定人群中出现心肌梗死等严重副作用,需要进一步的研究来阐述其作用机制并调控其活性以获得最佳的治疗收益。

参考文献

- [1] Miyachi H. Structural biology-based exploration of subtype-selective agonists for peroxisome proliferator-activated receptors [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (17):9223.
- [2] Huttunen JK, Heinsalmi P, Manninen V, et al. Helsinki Heart Study. New perspectives in the prevention of coronary heart disease [J]. *Drugs*, 1988, 36 (suppl 3):32-36.
- [3] Goldenberg I, Benderly M, Goldbourt U. Secondary prevention with bezafibrate therapy for the treatment of dyslipidemia; an extended follow-up of the BIP trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51 (4):459-465.
- [4] Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, et al. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362 (17):1563-1574.
- [5] Wayman NS, Hattori Y, McDonald MC, et al. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- γ and PPAR- α) reduce myocardial infarct size [J]. *FASEB J*, 2002, 16 (9):1027-1040.
- [6] Yue TL, Bao W, Jucker BM, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α protects the heart from ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2003, 108 (19):2393-2399.
- [7] Sambandam N, Morabito D, Wagg C, et al. Chronic activation of PPAR α is detrimental to cardiac recovery after ischemia [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290 (1):H87-H95.
- [8] Liu JR, Cai GY, Ning YC, et al. Caloric restriction alleviates aging-related fibrosis of kidney through downregulation of miR-21 in extracellular vesicles [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (18):18052-18072.
- [9] Keech A, Simes RJ, Barter P, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2005, 366 (9500):1849-1861.
- [10] Xu Y, Lu L, Greyson C, et al. The PPAR- α activator fenofibrate fails to provide myocardial protection in ischemia and reperfusion in pigs [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 290 (5):H1798-H1807.
- [11] Shao Y, Chen J, Dong LJ, et al. A protective effect of PPAR α in endothelial progenitor cells through regulating metabolism [J]. *Diabetes*, 2019, 68 (11):2131-2142.
- [12] Ibarra-Lara L, Sánchez-Aguilar M, Soria-Castro E, et al. Clofibrate treatment decreases inflammation and reverses myocardial infarction-induced remodeling in a rodent experimental model [J]. *Molecules*, 2019, 24 (2):270.
- [13] Papatheodorou I, Galatou E, Panagiotidis GD, et al. Cardioprotective effects of PPAR β/δ activation against ischemia/reperfusion injury in rat heart are associated with ALDH2 upregulation, amelioration of oxidative stress and preservation of mitochondrial energy production [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (12):6399.
- [14] Kappert K, Böhm M, Schmieder R, et al. Impact of sex on cardiovascular outcome in patients at high cardiovascular risk: analysis of the Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE-Intolerant Subjects with Cardiovascular Disease (TRANSCEND) and the Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global End Point Trial (ONTARGET) [J]. *Circulation*, 2012, 126 (8):934-941.
- [15] Wagner N, Wagner KD. PPARs and angiogenesis—Implications in pathology [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (16):5723.
- [16] Jucker BM, Doe CP, Schnackenberg CG, et al. PPAR δ activation normalizes cardiac substrate metabolism and reduces right ventricular hypertrophy in congestive heart failure [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50 (1):25-34.
- [17] Wagner N, Wagner KD. PPAR beta/delta and the hallmarks of cancer [J]. *Cells*, 2020, 9 (5):1133.
- [18] Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes [J]. *N Engl J Med*, 2007, 356 (24):2457-2471.
- [19] Jang SY, Jang J, Yang DH, et al. Impact of insulin therapy on the mortality of acute heart failure patients with diabetes mellitus [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2021, 20 (1):180.
- [20] Graham DJ, Ouellet-Hellstrom R, MacCurdy TE, et al. Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone [J]. *JAMA*, 2010, 304 (4):411-418.
- [21] Kaul S, Bolger AF, Herrington D, et al. Thiazolidinedione drugs and cardiovascular risks: a science advisory from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation [J]. *Circulation*, 2010, 121 (16):1868-1877.
- [22] Doney AS, Fischer B, Leese G, et al. Cardiovascular risk in type 2 diabetes is associated with variation at the PPAR γ locus: a Go-DARTS study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (12):2403-2407.
- [23] Zou G, Zhou Z, Xi X, et al. Pioglitazone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury via inhibition of NF- κ B activation and inflammation in rats [J]. *Front Physiol*, 2021, 12:707344.
- [24] Chandra M, Miriyala S, Panchatcharam M. PPAR γ and its role in cardiovascular diseases [J]. *PPAR Res*, 2017, 2017:6404638.
- [25] Liu HR, Tao L, Gao E, et al. Rosiglitazone inhibits hypercholesterolemia-induced myeloperoxidase upregulation—A novel mechanism for the cardioprotective effects of PPAR agonists [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 81 (2):344-352.
- [26] Shehata AHF, Ahmed AF, Abdelrehim AB, et al. The impact of single and combined PPAR- α and PPAR- γ activation on the neurological outcomes following cerebral ischemia reperfusion [J]. *Life Sci*, 2020, 252:117679.
- [27] Zhang XJ, Xiong ZB, Tang AL, et al. Rosiglitazone-induced myocardial protection against ischaemia-reperfusion injury is mediated via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37 (2):156-161.
- [28] Zhou L, Wang ZZ, Xiao ZC, et al. Effects of PPAR- γ in the myocardium on the development of ventricular septation [J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40 (2):313-319.
- [29] Zhao X, Wang F, Zhou R, et al. PPAR α/γ antagonists reverse the ameliorative effects of osthole on hepatic lipid metabolism and inflammatory response in steatohepatic rats [J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26 (2):425-433.
- [30] Cheng HS, Tan WR, Low ZS, et al. Exploration and development of PPAR modulators in health and disease: an update of clinical evidence [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (20):5055.