Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:26 +0330 on Tuesday September 26th 2017

پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۱، شماره ۱، بهار ۱۳۸۶، صفحات ۳۳ تا ۳۷

مقاله اصلی
(Original Article)

مقایسه روش‌های پروتئین‌زدایی در سنجش نیتریک اکساید سرمی به روش گریس

دکتر اصغر قاسمی*، دکتر مهدی هدایتی*، حامد بیابانی*، دکتر علی خوش‌باطن، دکتر علیرضا عسگری****

* مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
**گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)

چکیده

سابقه و هدف: *نیتریک‌اکساید در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک نقش دارد. اخیرا توجه زیادی به اندازه‌گیری نیتریک‌اکساید سرمی معطوف شده است. ما در مطالعه قبلی روشی ساده، ارزان و سریع برای اندازه‌گیری نیتریک‌اکساید سرمی را طبق واکنش گریس ارزیابی کردیم. از آنجایی که پروتئین‌زدایی نمونه‌ها برای سنجش نیتریک‌اکساید سرمی با روش گریس ضروری است، در این مطالعه روش‌های مختلف پروتئین‌زدایی سرم برای سنجش نیتریک اکساید سرمی مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *ده روش پروتئین‌زدایی شامل استفاده از متانل، اتانل، سولفات روی، متانل/دی‌اتیل‌اتر، استونیتریل، TCA، PCA، تنگستات سدیم و سولفات آمونیوم و فیلتر ۱۰۰۰۰ دالتونی، روی ۴۲ نمونه سرم انسانی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج سنجش نیتریک‌اکساید در روش‌های مختلف با روش فیلتر به عنوان مرجع مقایسه شد. همچنین میزان نیتریک اکساید در ۶۰ نمونه سرمی تهیه شده از افراد بالغ داوطلب سنجش گردید.*

یافته‌ها: *ضریب همبستگی رسوب‌دهی با متانل، اتانل، سولفات روی، متانل/ دی‌اتیل‌اتر، استونیتریل، TCA، PCA، تنگستات سدیم و سولفات آمونیوم با روش فیلتر به ترتیب ۰/۸۴، ۰/۹۲، ۰/۹۱، ۰/۷۹، ۰/۸۸، ۰/۸۵، ۰/۹۳، ۰/۵۳ و ۰/۷۸ با P< ۰/۰۰۱ بود. متانل، اتانل و متانل/ دی‌اتیل‌اتر سبب تخمین بیش از حد و TCA، PCA، تنگستات‌سدیم و سولفات‌آمونیوم سبب تخمین کمتر از حد نیتریک‌اکساید سرمی در مقایسه با فیلتر شدند. نتایج سنجش نیتریک اکساید در سرم افراد بالغ دارای توزیع نرمال با میانگین ± خطای معیار ۳۳±۱/۳ میکرومول در لیتر بود.*

نتیجه‌گیری: *اگر چه در مطالعات مختلف از روش‌های متفاوتی جهت پروتئین‌زدایی نمونه‌های سرمی جهت سنجش نیتریک‌اکساید استفاده می‌شود، طبق نتایج حاصل از این مطالعه به نظر می‌رسد استفاده از سولفات روی بهترین انتخاب باشد.*

واژگان کلیدی: *نیتریک‌اکساید، پروتئین‌زدایی، واکنش گریس، سرم.*

مقدمه

به‌دلیل کوتاه‌بودن نیمه‌عمر نیتریک‌اکساید ، اندازه‌گیری مستقیم آن نسبتا مشکل است (۱،۲)، لذا اندازه‌گیری آن با استفاده از متابولیت‌های پایدارش یعنی نیتریت و نیترات صورت می‌گیرد. این سنجش تخمین قابل‌اطمینانی از برون‌ده نیتریک‌اکساید در محیط *in vivo* فراهم می‌آورد (۲). همبستگی بالایی بین تولید نیتریک‌اکساید درون‌زا و سطوح نیتریت/ نیترات (NOx) در سرم، پلاسما و ادرار گزارش شده است (۳). ساده‌ترین و رایج‌ترین روش اندازه‌گیری این آنیون‌ها روش رنگ‌سنجی بر مبنای واکنش گریس (Griess) می‌باشد. اساس این واکنش تشکیل رنگ از دی‌آزوتاسیون (diazotization) یک سولفانامید به کمک نیتریت در محیط اسیدی و سپس کنژوگاسیون آن با یک آمین آروماتیک مثل

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دکتر اصغر قاسمی (**email:** Ghasemi@erc.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۸/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۲/۱۷

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:26 +0330 on Tuesday September 26th 2017

NEDD (N-1-(naphthyl)ethylenediamine) می‌باشد. دلایلی مانند ساده بودن روش، عدم‌نیاز به ابزار گران‌قیمت، امکان انجام آزمون توسط آنالیزورهای خودکار، قابلیت استفاده از نمونه‌های مختلف مانند محیط کشت، سرم، پلاسما، ادرار و مایع مغزی نخاعی سبب کاربرد گسترده این روش شده است (۲). به‌دلیل تداخل کدورت ناشی از رسوب پروتئین، مرحله پروتئین‌زدایی برای نمونه‌های سرمی و پلاسمایی در واکنش گریس ضروری است (۱،۴،۵). برای اندازه‌گیری NOx از روش‌های مختلفی جهت پروتئین‌زدایی سرم استفاده شده است. فیلتر نمودن سرم توسط فیلترهای ۳۰ (۲) و ۱۰ کیلودالتونی (۶) که سبب جدا شدن پروتئین‌های سرم ضمن سانتریفوژ از این فیلترها می‌گردد، اضافه نمودن اتانل (۲،۷)، ترکیب متانل/ دی‌اتیل‌اتر (۲،۴) و سولفات روی (۴،۵) به نمونه‌های سرمی از روش‌های رایج برای منظور فوق محسوب می‌گردند. علی‌رغم استفاده از روش‌های مختلف پروتئین‌زدایی برای سنجش نیتریک‌اکساید سرمی هنوز مطالعه‌ای جهت مقایسه روش‌های مختلف پروتئین‌زدایی صورت نگرفته است. هدف این مطالعه مقایسه روش‌های مختلف پروتئین‌زدایی در سنجش نیتریک‌اکساید سرمی طبق واکنش گریس می‌باشد.

مواد و روشها

از سولفانامید، NEDD: N-1-(naphthyl)ethylenediamine، اسید فسفریک، متانول، اتانل، استونیتریل، سولفات‌روی، دی‌اتیل‌اتر، اسید تری‌کلرواستیک (TCA)، اسید پرکلرواستیک (PCA)، تنگستات سدیم و سولفات آمونیوم ساخت شرکت مرک (آلمان) و از Vanadium [III]-chloride ساخت شرکت فلوکا (سویس) استفاده شد. پلیت الیزا از شرکت نانک (دانمارک) تهیه گردید.

چهل‌ودو نمونه سرمی از افراد داوطلب به صورت اتفاقی گرفته‌شد. جهت پروتئین‌زدایی با حلال‌های متانول و استونیتریل ۳۰۰ میکرولیتر از سرم با ۳۰۰ میکرولیتر از حلال‌های مذکور مخلوط گردید (۸،۹). در مورد اتانل، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۴۰۰ میکرولیتر از حلال مخلوط شد (۷). برای پروتئین‌زدایی با سولفات‌روی ۴۰۰ میکرولیتر نمونه با ۶ میلی‌گرم پودر سولفات‌روی مخلوط گردید (۵). برای پروتئین زدایی توسط مخلوط متانل/ دی‌اتیل‌اتر و TCA ۹۰۰ میکرولیتر از مخلوط متانول/ دی‌اتیل‌اتر (۳ به ۱) و TCA ۵ درصد به ۱۰۰ میکرولیتر نمونه اضافه گردید (۱،۹). برای پروتئین‌زدایی با PCA محلول ۰/۶ نرمال PCA با نسبت حجمی مساوی با نمونه مخلوط گردید (۹). در مورد تنگستات‌سدیم ۱ میلی‌لیتر از محلول ۱ درصد تنگستات سدیم (تهیه شده در اسید سولفوریک ۶۷ میلی مولار) به ۱۰۰ میکرولیتر سرم اضافه گردید (۹). در روش دیگر به‌ازای هر میلی‌لیتر نمونه، ۶۰۰ میلی‌گرم پودر سولفات‌آمونیوم اضافه شد (۹). برای پروتئین‌زدایی توسط فیلتر که در این مطالعه به‌عنوان روش مرجع استفاده شد، سرم‌ها از فیلترهای ۱۰ کیلودالتونی عبور داده شدند (۲). در تمام موارد فوق، نمونه‌ها پس از مخلوط شدن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و از محلول فوقانی جهت اندازه‌گیری NOx استفاده شد.

سنجش نیترِیک‌اکساید توسط واکنش گریس به روش میکروپلیتی انجام پذیرفت (۱۰). برای اندازه‌گیری غلظت نیتریت و نیترات (NOx) تام، در یک میکروپلیت الایزا ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر سرم پروتئین‌زدایی شده، و سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلریدوانادیوم (III) (۸ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر) اضافه شد تا نیترات‌ها به نیتریت تبدیل شوند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط (۱ به ۱) سولفانامید و NEDD افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. بعد از انجام واکنش و تشکیل رنگ، جذب نوری حاصل از تشکیل ماده رنگی در ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الایزا (Sunrise, Tecan, Austria) قرائت گردید و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌ها محاسبه شد. غلظت‌های منحنی استاندارد شامل ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومول در لیتر بود.

داده‌ها به‌صورت میانگین± خطای معیار یا درصد بیان شد. برای تعیین ضریب همبستگی بین نتایج روش‌های مختلف پروتئین‌زدایی با نتایج روش فیلتر، از ضریب همبستگی پیرسون محاسبه شد. برای مقایسه روش‌های مختلف پروتئین‌زدایی، سنجش بر روی ۴۲ نمونه سرم به‌صورت دوتایی انجام شد. سپس سطح سرمی متابولیت‌های نیتریک‌اکساید سرمی ۶۰ نمونه تهیه شده از افراد داوطلب بالغ اندازه‌گیری شد. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۱/۵) استفاده شد.

یافته‌ها

ضریب همبستگی پیرسون بین نتایج حاصل از فیلتر با روش‌های رسوب‌دهی توسط متانل، اتانل، سولفات‌روی، متانل/ دی‌اتیل‌اتر، استونیتریل، TCA، PCA، تنگستات سدیم

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:26 +0330 on Tuesday September 26th 2017

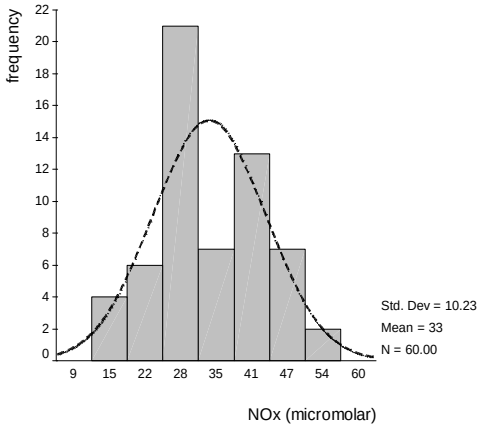
و سولفات آمونیوم به ترتیب ۰/۸۴، ۰/۹۲، ۰/۹۱، ۰/۷۹، ۰/۸۸، ۰/۸۵، ۰/۹۳، ۰/۵۳ و ۰/۷۸ بود. نتایج سنجش نیتریک‌اکساید با روش‌های مختلف پروتئین‌زدایی و مقایسه نتایج حاصله با روش پروتئین‌زدایی فیلتر به عنوان روش مرجع در جدول یک آورده شده است.

جدول ۱- همبستگی بین روش‌های مختلف پروتئین‌زدایی با روش پروتئین‌زدایی توسط فیلتر*

روش پروتئین‌زدایی	میانگین†	میانگین‡	ضریب همبستگی پیرسون
متانل (n=۴۲)	۴۹±۴	۱۳۶	۰/۸۴
اتانل (n=۴۲)	۵۲±۴	۱۴۴	۰/۹۲
سولفات‌روی (n=۴۲)	۳۳±۲	۹۲	۰/۹۱
متانل/دی‌اتیل‌اتر (n=۴۰)	۴۰±۳	۱۱۱	۰/۷۹
استونیتریل (n=۴۲)	۳۴±۳	۹۴	۰/۸۸
TCA (n=۴۲)	۳۱±۳	۸۶	۰/۸۵
PCA (n=۴۲)	۲۳±۲	۶۴	۰/۹۳
تنگستات‌سدیم (n=۴۲)	۲۴±۳	۶۷	۰/۵۳
سولفات‌آمونیوم (n=۳۸)	۱۰±۱	۲۸	۰/۷۸
فیلتر (n=۴۲)	۳۶±۳	۱۰۰	۱

* در تمامی موارد فوق ضریب همبستگی معنی‌داری با روش فیلتر مشاهده شد.
† میانگین±خطای معیار (میکرومول در لیتر) ‡ درصد از میانگین فیلتر

نتایج حاصل از اندازه‌گیری نیتریک‌اکساید روی نمونه‌های سرمی ۶۰ فرد داوطلب بالغ و سالم (با میانگین سنی ۹±۴۷ و دامنه سنی ۳۲ تا ۶۷ سال) که پروتئین‌زدایی آنها با استفاده از سولفات‌روی انجام شد، نشان داد که میانگین±خطای معیار آن ۱/۳± ۳۳ میکرومول‌درلیتر (دامنه ۵۷-۱۴ میکرومول‌درلیتر) بود. هم‌چنین بر اساس نتایج تست K-S توزیع نمونه‌ها نرمال به‌دست آمد. این نتایج در نمودار۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱- نتایج اندازه‌گیری نیتریک‌اکساید سرمی در نمونه‌های سالم (توزیع نرمال)

بحث

در این مطالعه ۱۰ روش رایج پروتئین‌زدایی در اندازه‌گیری نیتریک‌اکساید سرمی به روش گریس مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اکثر روش‌های مورد استفاده برای پروتئین‌زدایی نمونه سرمی جهت اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک‌اکساید همبستگی نسبتا خوبی با روش فیلتر به عنوان روش مرجع دارند. اما برخی روش‌ها سبب تخمین بیش از میزان و برخی سبب تخمین کمتر از میزان این متابولیت‌ها در مقایسه با روش پروتئین‌زدایی توسط فیلتر می‌شوند. اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک‌اکساید سرمی، اگر چه به روش‌های مختلفی قابل انجام است، ولی اغلب به روش کالریمتری گریس انجام می‌شود (۱). در این روش با توجه به تداخل کدورت ناشی از رسوب تشکیل شده، باید نمونه قبل از اندازه‌گیری، پروتئین‌زدایی شود. از بین روش‌های مورد استفاده در این مطالعه، روش‌های جداسازی با فیلتر (۲) و رسوب‌دهی با اتانل (۷)، سولفات‌روی (۵)، PCA (۱۱)، متانل (۸)، متانل/ دی‌اتیل‌اتر (۱) و استونیتریل (۱۲) حداقل یک بار قبلا برای اندازه گیری NOx سرمی استفاده شده‌اند. سایر روش‌ها نیز به منظور رسوب‌دهی پروتئین استفاده شده‌اند، اما جهت اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک‌اکساید نبوده‌است (۹،۱۳). برخی مطالعات خاطر نشان ساخته‌اند که به‌دلیل تبدیل نیتریت به نیتریک‌اکساید و دی‌اکسید نیتروژن فرار در محیط اسیدی، از اندازه‌گیری متابولیت‌های نیتریک‌اکساید سرمی در محیط‌های اسیدی پرهیز باید نمود (۲،۴)، اما در یک مطالعه از اسید پرکلریک برای اندازه‌گیری متابولیت‌های پلاسمایی نیتریک‌اکساید استفاده شده است (۱۱). نتایج یک مطالعه نشان می‌دهد که پروتئین‌زدایی با سولفات‌روی سبب کاهش دقت و تکرارپذیری در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکرومولار نیتریک‌اکساید می‌شود. قابل ذکر است که در مطالعه مذکور جهت احیاء نیترات به نیتریت از آنزیم نیترات‌ردوکتاز باکتریایی استفاده شده بود (۱). استفاده از روش رسوب‌دهی با سولفات‌روی به‌دلیل جلوگیری از ایجاد کدورت در مراحل بعدی واکنش گریس نتایج خوبی داشته و مورد استفاده بسیاری از محققین و مورد مصرف در بسیاری از کیت‌ها می‌باشد. به‌علاوه مانند کلیه روش‌های پروتئین‌زدایی شیمیایی، ارزان‌قیمت نیز هست (۴). در این مطالعه از پودر سولفات‌روی جهت پروتئین‌زدایی استفاده شد. مزیت این‌کار رقیق‌سازی حداقل نمونه‌ها و کاهش تداخل آسکوربات و فسفات است (۱۴). جدول یک نشان می‌دهد که استفاده از

متانول، اتانل و مخلوط متانول/ دی‌اتیل‌اتر سبب تخمین بیش از حد نیتریک‌اکساید سرمی می‌گردد که تا حدی مشابه نتایج رومیتلی و همکاران (۲۰۰۷) در اندازه‌گیری نیتریک‌اکساید سرمی می‌باشد (۱۵). استفاده از استونیتریل از نظر همبستگی با روش فیلتر و نزدیکی میانگین داده‌ها، نسبتا خوب عمل کرده است. طبق نتایج این مطالعه استفاده از PCA، تنگستات سدیم و سولفات آمونیوم جهت پروتئین‌زدایی قبل از سنجش نیتریک اکساید سرمی عملکرد خوبی نداشته است. از مزیت‌های استفاده از فیلتر، عدم نیاز به رقیق‌سازی نمونه‌هاست اما طولانی بودن (۱ تا ۳ ساعت) و هزینه بالا از معایب آن محسوب می‌گردد (۴).

در این مطالعه، دامنه سنجش نیتریک‌اکساید سرمی ۵۷-۱۴ و میانگین آن ۳۳ میکرومول در لیتر است. این اعداد تطابق خوبی با یافته‌های سایر مطالعات دارد، به‌طوری‌که گرین و همکاران میزان نیتریک‌اکساید پلاسما را در دامنه ۶۰-۱۵ میکرومولار (۱۶) و Guevara میانگین نیتریک‌اکساید سرمی را ۳۴/۹ میکرومول در لیتر گزارش کرد (۱).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت، اگر چه پروتئین‌زدایی نمونه‌های سرمی برای سنجش نیتریک‌اکساید به روش‌های مختلفی قابل انجام است، اما به نظر می‌رسد به‌غیر از روش فیلتر، استفاده از پودر سولفات‌روی و استونیتریل برای این منظور مناسب‌تر باشد. همچنین استفاده از PCA، تنگستات‌سدیم و سولفات‌آمونیوم جهت پروتئین‌زدایی قبل از سنجش نیتریک‌اکساید سرمی توصیه نمی‌شود.

تشکر و قدردانی

هزینه انجام این پژوهش به طور مشترک توسط مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) تامین شده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از زحمات سرکار خانم وجیهه خراسانی که در اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی کمک نمودند، ابراز می‌دارند.

REFERENCES

1. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by simple Griess reaction. Clin Chim Acta 1998; 274: 177-88.
2. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide 2001; 5: 62-71.
3. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JBJr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. Methods Enzymol 1996; 268: 142-51.
4. Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. Sensors 2003; 3: 278-84.
5. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Janson LM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. Clin Chem 1995; 41: 892-96.
6. Ricart- Jane D, Llobera M, Lopez-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrite/nitrate quantification by Griess method. Nitric Oxide 2002; 6: 178-85.
7. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. Hypertension 1998; 31: 1248-54.
8. Himeno M, Ishibashi T, Nakano S, Furuya K, Kigoshi T, Uchida K, et al. A practical procedure for achieving a steady state of NOx concentration in plasma: with special reference to the NOx content of Japanese daily food. Tohoku J Exp Med 2003; 199(2): 95-110.
9. Sakuma R, Nishina T, Kitamura M. Deproteinizing methods evaluated for determination of uric acid in serum by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. Clin Chem 1987; 33: 1427-30.
۱۰. قاسمی ا، هدایتی م، خوش باطن ع. ارزیابی روشی ساده و سریع برای اندازه گیری نیتریک اکساید سرمی در میکروپلیت. مجله غدد درون ریز و متابولیسم ایران. ۱۳۸۴، دوره هفتم، ضمیمه شماره ۴: صفحات۴۳۳ تا ۴۳۹.
11. Tanaka S, Yashiro A, Nakashima Y, Nanri H, Ikeda M, Kuroiwa A. Plasma nitrite/nitrate level is inversely correlated with plasma low-density lipoprotein cholesterol level. Clin Cardiol 1997; 20: 361-65.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:26 +0330 on Tuesday September 26th 2017

12. Friedberg MA, Hinsdale ME, Shihabi ZK. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. J Chromatogr A 2004; 1023: 317-20.

13. Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. J Chromatogr A 2004; 1023(2): 317-20.

14. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. Clin Chem 1990; 36: 1440 –43.

15. Romitelli F, Santini SA, Chierici E, Pitocco D, Tavazzi B, Amorini AM, et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC–MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. J Chromatogr B 2007 [In press].

16. Green, LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of Nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem 1982; 126: 131-8.

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:26 +0330 on Tuesday September 26th 2017