

**ЭКСТРЕННАЯ ПРОФИЛАКТИКА ГАСТРОСТАЗА У КРЫС
ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ МИЕЛОАБЛЯЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ
ЦИКЛОФОСФАНОМ**

Вакуненко О.А., Ивницкий Ю.Ю., Краснов К.А., Краснова А.А.

Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального
медико-биологического агентства, 192019, Санкт-Петербург, institute@toxicology.ru

Резюме. Изучали влияние вводимого в желудок гидрокарбоната натрия (NaHCO_3) на формирование желудочно-кишечного стаза, острого цитостатического мукозита тонкой кишки и экскрецию индикана с мочой при моделировании на крысах миелоабляционной цитостатической терапии внутривенным введением циклофосфана (ЦФ). Введение ЦФ в дозе 390 мг/кг вело к дистрофическим изменениям в слизистой оболочке тонкой кишки, развитию в течение ближайших суток желудочно-кишечного стаза с преобладанием гастростаза и повышению экскреции индикана. Введение за 30 мин до и тотчас после ЦФ в желудок крыс NaHCO_3 в дозе, эквивалентной 350 мл его 4 % раствора для человека, смягчало проявления гастростаза и избыточного роста индол-продуцирующей желудочно-кишечной микрофлоры. Представленный подход к экстренной медикаментозной профилактике желудочно-кишечных осложнений миелоабляционной цитостатической фармакотерапии перспективен для апробации при использовании в качестве цитостатического агента не только ЦФ, но и других медикаментозных средств алкилирующего действия.

Ключевые слова: циклофосфан; миелоабляционная цитостатическая терапия; крысиная модель; гастростаз; индикан; гидрокарбонат натрия; экстренная профилактика

**EMERGENCY PREVENTION OF GASTROSTASIS IN THE CYCLOPHOSPHAMIDE
MYELOABLATIVE CHEMOTHERAPY RAT MODEL**

Vakunenkova O.A., Ivnitsky Ju.Ju., Krasnov K.A., Krasnova A.A.

«Golikov Research Center of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency of Russia,
192019, Saint Petersburg, institute@toxicology.ru

Abstract. The effect of sodium bicarbonate (NaHCO_3) administered by gavage on the formation of gastrointestinal stasis and urinary indican excretion was studied in a rat model of myeloablative cytostatic therapy with intravenous cyclophosphamide (CP). The introduction of CP at a dose of 390 mg/kg led to the development of gastrointestinal stasis within 24 hours with a predominance

of gastrostasis and an increase in indican excretion. The introduction of NaHCO_3 into the stomach of rats 30 minutes before and immediately after CP at a dose equivalent to 350 ml of its 4% solution for humans alleviated the manifestations of gastrostasis and overgrowth of indole-producing gastrointestinal microflora. The presented approach to emergency pharmaceutical prevention of gastrointestinal complications of myeloablative cytostatic pharmacotherapy is promising for testing when using not only CP as a cytostatic agent, but also other alkylating drugs.

Key words: cyclophosphamide; myeloablative cytostatic therapy; rat model; gastrostasis; indican; sodium bicarbonate; emergency prevention

Введение. Ранее мы показали задержку рентгенологической тени сульфата бария, введённого в желудок крысам, при острой интоксикации циклофосфаном [1], что характерно для желудочно-кишечного стаза (ЖКС). Это потенциально летальное осложнение нередко возникает при подготовке пациентов к пересадке стволовых кроветворных клеток – миелоабляционной цитостатической терапии [2]; у некоторых реципиентов рентгенологическая тень желудка распространяется на значительную часть не только брюшной, но и грудной полости [3]. Клиническая значимость ЖКС обусловлена его негативным влиянием на исход химиотерапии. Он препятствует питанию пациентов, лишает смысла пероральное назначение им медикаментозных средств; сопровождающий его избыточный рост кишечной микрофлоры ведёт к реализации кворум-эффекта [4], интенсификации образования ею токсичных веществ, формированию эндотоксемии и эндотоксикоза. ЖКС способствует повреждению энтерогематического барьера с поступлением в кровь липополисахаридов грамотрицательных бактерий, развитием системного воспаления [5] и сепсиса [6]. ЖКС вовлечён в патогенез поздней цитостатической рвоты; однако назначение таким пациентам противорвотных [7, 8], прокинетических или спазмолитических средств [7] не устраняет острый цитостатический желудочно-кишечный мукозит, защитной реакцией на первую стадию которого, предположительно, является ЖКС [9]. Более перспективным подходом к его профилактике при миелоабляционном кондиционировании представляется применение энтеропротекторов – медикаментозных средств, предупреждающих развитие острого желудочно-кишечного мукозита. При использовании для цитостатической терапии циклофосфана (ЦФ) энтеропротективный эффект, гипотетически, может быть достигнут ощелачиванием желудочно-кишечного химуса. С повышением pH биосред замедляется спонтанный гидролиз образовавшегося в печени активного метаболита ЦФ, альдофосфамида, тормозится накопление более токсичных метаболитов: акролеина и фосфорамидного иприта [10], повышается активность ключевого фермента,

обеспечивающего детоксификацию ЦФ – альдегиддегидрогеназы, оптимум pH которой лежит в щелочном интервале значений [11]. Более высокие в норме в сравнении с опухолевыми клетками значения pH цитоплазмы способствуют избирательности противоопухолевого действия ЦФ [12]. Закисление химуса введением в желудок слабых растворов кислот [13] или лактулозы [14] отягощало острую интоксикацию циклофосфаном у крыс. При введении в желудок, ЦФ вызывал у них более выраженный ЖКС, чем при внутрибрюшинном введении в той же дозе, что может быть отчасти обусловлено его более интенсивной токсификацией в кислой среде [1].

Целью настоящей работы была проверка гипотезы о том, что ощелачивающий агент, NaHCO_3 , вводимый в желудок при моделировании на крысах миелоабляционной цитостатической терапии циклофосфаном, проявит профилактическую активность в отношении ЖКС.

Материалы и методы. Использовали самцов крыс-альбиносов линии Вистар (161-190 г), приобретённых в питомнике ФГУП «ПЛЖ «Рапполово». При работе с животными соблюдали «Правила лабораторной практики», утверждённые Приказом Минздравсоцразвития России № 708н от 23 августа 2010 г. Рацион состоял из стандартного корма для крыс и питьевой воды *ad libitum*. Животных случайным образом распределяли по экспериментальным группам. Для лишения корма их на заданное время помещали в клетки с решётчатым полом (исключавшим копрофагию и поедание элементов подстилки) при доступе только к воде. Миелоабляционную цитостатическую терапию моделировали однократным введением в латеральную вену хвоста в объёме 10 мл/кг свежеприготовленного водного раствора препарата «Эндоксан» производства Бакстер онкология ГМБХ, Германия, в дозе 390 мг/кг ($\approx 1,7 \text{ LD}_{99/30 \text{ сут}}$), что для человека эквивалентно суточной дозе 60 мг/кг , в которой его включают в схемы миелоабляционного кондиционирования [15]. Лапаротомию, забор крови из воротной вены, извлечение органов проводили под масочным фторотановым наркозом. Выраженность ЖКС оценивали по относительной массе желудочного и слепкишечного химусов, которую рассчитывали как разность масс заполненного химусом и пустого органа (*gaster, caecum*), г, отнесённую к массе тела, кг.

На первом этапе работы изучали динамику формирования ЖКС после миелоабляционного воздействия. Для этого животных распределяли в семь групп, из которых первая была представлена интактными крысами, имевшими неограниченный доступ к корму, три другие — лишёнными доступа к корму через 4, 24 или 48 ч после введения ЦФ, и три оставшиеся — лишёнными доступа к корму в те же сроки, но не

получавшими ЦФ. Через 72 ч после введения ЦФ всех животных лапаротомировали и определяли у них выраженность ЖКС.

На втором этапе работы оценивали влияние NaHCO_3 на выраженность ЖКС и на интенсивность роста желудочно-кишечной микрофлоры. Для этого использовали крыс, лишённых доступа к корму с 24 по 72 ч после введения ЦФ. Животных распределяли в пять групп, из которых первая была представлена интактными особями, а остальные – получившими ЦФ. Крысам второй группы вводили только ЦФ; третьей – в желудок вводили 4 % раствор NaHCO_3 ($\text{pH} = 8,34$) в объёме 15 мл/кг за 30 мин до введения ЦФ. В четвёртой группе введение NaHCO_3 за 30 мин до ЦФ дополняли повторным введением NaHCO_3 в той же дозе тотчас после введения ЦФ; в пятой группе NaHCO_3 вводили в желудок четырежды: за 30 мин до, тотчас после, через 60 и 120 мин после введения ЦФ. Через 48 ч после введения ЦФ всех крыс помещали в метаболические камеры для сбора мочи; в мочеприемники вносили по 50 мкл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты в качестве консерванта. Через 72 ч после введения ЦФ оценивали выраженность ЖКС. Для оценки избирательности протективного действия NaHCO_3 параллельно с относительной массой химуса *gaster* и *caecum* определяли относительную массу селезёнки в качестве показателя цитостатического поражения кроветворной системы. В качестве показателя интенсивности роста желудочно-кишечной микрофлоры использовали экскрецию индикана с мочой [16]. Объём собранной за сутки мочи измеряли и в ней количественно определяли показатель кишечного эндотоксикоза, индикан [17], экскрецию которого с мочой выражали в микрограммах на килограмм массы тела в час.

Результаты представляли в виде среднего значения и его ошибки ($M \pm m$). Влияние вводимых веществ на исследуемые количественные показатели оценивали с помощью дисперсионного анализа. В случаях значимости полученных моделей межгрупповое сравнение средних величин выполняли с помощью теста честной значимой разницы Тьюки [18]. Связь между признаками выражали с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена r_s . Критический уровень значимости α приняли равным 0,05.

Результаты исследования. Через 3 сут после введения ЦФ у крыс, лишённых корма за 48 ч до лапаротомии, расширенный и заполненный химусом желудок занимал бо́льшую часть объёма брюшной полости; у интактных животных он выглядел пустым. Объём слепой кишки на фоне введения ЦФ был увеличен в меньшей степен (рисунок 1)

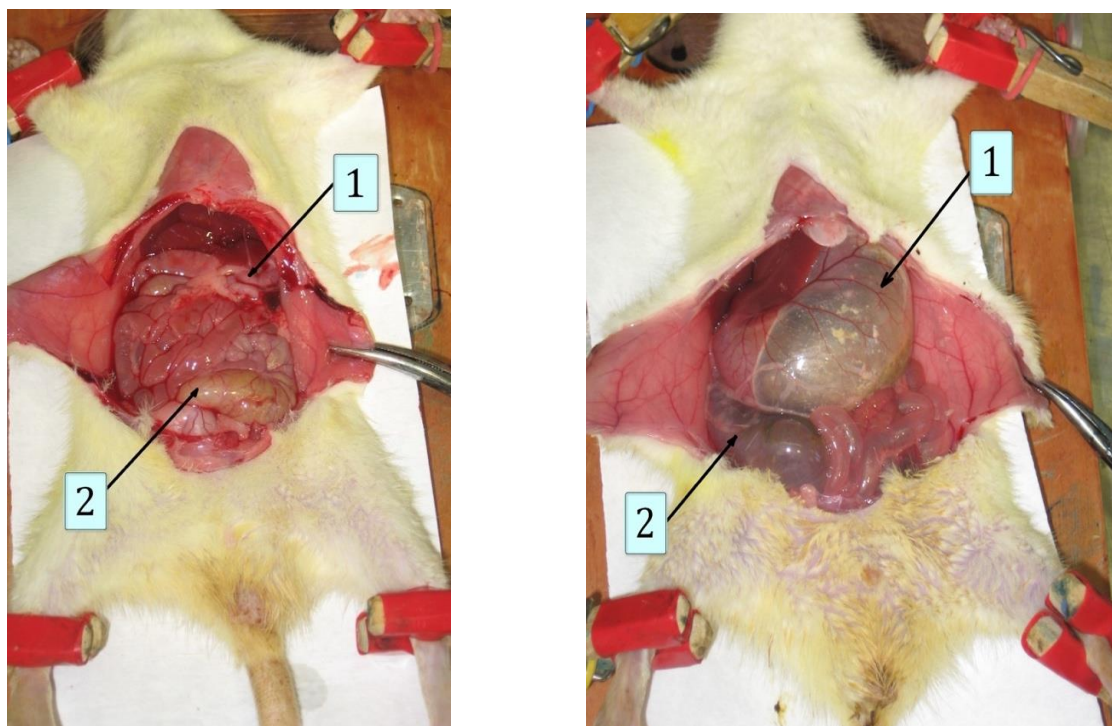


Рисунок 1 – Органы брюшной полости крыс, лишённых доступа к корму за 48 ч до лапаротомии: слева — интактная; справа — через 72 ч после внутривенного введения циклофосфана в дозе 390 мг/кг.

Стрелками показаны: 1 — желудок; 2 — слепая кишка

Корм, съеденный в ближайшие 24 ч после введения ЦФ, оставался в желудке в течение последующих 48 ч, что вело к увеличению относительной массы желудочного химуса в 7-13 раз. Избыточное накопление химуса в слепой кишке было представлено в виде тенденции (рисунок 2).

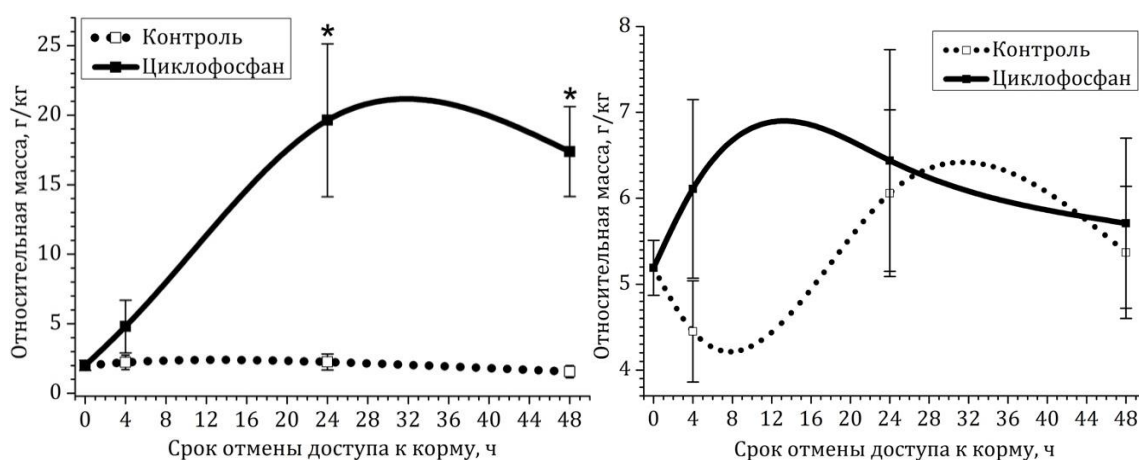


Рисунок 2 – Относительная масса желудочного (слева) и слепки (справа) химуса у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфана в дозе 390 мг/кг, $M \pm m$, $n = 10$, в зависимости от продолжительности доступа к корму с момента затравки

Контроль - животные, не получавшие циклофосфан. В начале оси абсцисс — значения в группе крыс, не получавших циклофосфан и имевших неограниченный доступ к корму; * - значимое различие с контролем, $p < 0,05$

У животных, получивших ЦФ, масса тела в день лапаротомии составляла меньшую долю от её исходного значения, чем в контроле: $78,9 \pm 0,8 \%$ против $86,2 \pm 0,5 \%$ ($p < 0,05$).

Введение в желудок NaHCO_3 за 30 мин до и тотчас после введения ЦФ частично предотвращало ЖКС: относительная масса желудочного химуса была, в среднем, в 2,6 раза меньше, чем у незащищённых крыс, хотя и оставалась втрое большей, чем у интактных. Снижение относительной массы слепки кишечника было представлено в виде тенденции. Четырёхкратное введение NaHCO_3 было не эффективнее двукратного, а однократное профилактическое введение NaHCO_3 было малоэффективным. Введение NaHCO_3 мало влияло на вызванную ЦФ гипотрофию селезёнки (рисунок 3, слева).

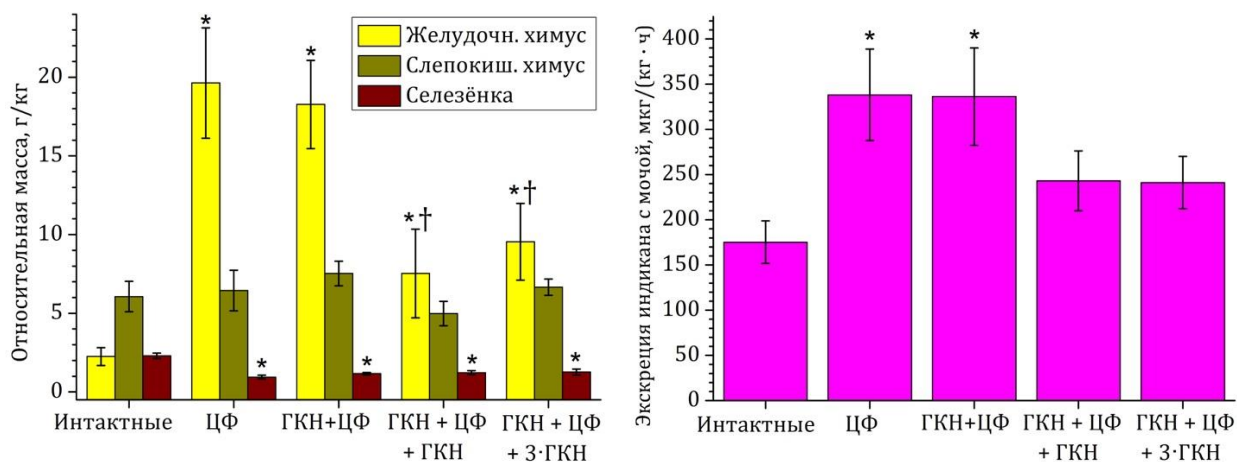


Рисунок 3 – Относительная масса желудочного, слепки кишечника химусов и селезёнки (слева) и экскреция индикана с мочой (справа) у крыс через 72 ч после внутривенного введения циклофосфана в дозе 390 мг/кг , $M \pm m$, $n = 10$

«Интakтные»: крысы, не получавшие медикаментозных средств; «ЦФ»: получившие только циклофосфан; «ГКН+ЦФ»: введение в желудок 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до циклофосфана; «ГКН+ЦФ+ГКН»: введение в желудок 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до и тотчас после циклофосфана; «ГКН+ЦФ+3·ГКН»: введение в желудок 4 % раствора гидрокарбоната натрия за 30 мин до, тотчас после, через 1 и 2 ч после циклофосфана. Все животные лишены доступа к корму через 24 ч после введения циклофосфана.

* — значимое различие с интактной группой, $p < 0,05$;

† — значимое различие с группами «ЦФ» и «ГКН+ЦФ», $p < 0,05$

Экскреция индикана с мочой после изолированного воздействия ЦФ была в среднем в 1,9 раза выше, чем у интактных крыс; на фоне двукратного введения в желудок NaHCO_3 это превышение было 1,4-кратным, проявляясь лишь в виде тенденции (рисунок 3, справа). У крыс, получивших ЦФ, этот показатель обнаруживал сильную отрицательную корреляцию ($r = -0,77$, $p < 0,01$) с массой тела в день лапаротомии, выраженной в процентах от массы тела до затравки. Экскреция индикана крысами, получившими только ЦФ, положительно коррелировала с относительной массой слепокишечного химуса ($r = 0,66$, $p < 0,05$); при введении, кроме ЦФ, NaHCO_3 корреляция была слабой ($r = 0,15$).

Обсуждение результатов. Моделирование на крысах миелоабляционной цитостатической терапии сопровождалось глубоким торможением пропульсивной функции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) с преобладанием гастростаза, формировавшегося в ближайшие часы после введения ЦФ. Транзит содержимого желудка превышал 3 сут. У здорового человека он составляет 10-48 мин [19], поэтому можно предположить, что гастростаз сопровождает большую часть курса миелоабляционного кондиционирования реципиентов стволовых кроветворных клеток, составляющего 3-5 сут [15]. Не исключена вовлечённость гастростаза в ухудшение общего состояния организма при миелоабляционной цитостатической терапии, на что указывает потеря животными почти четверти от исходной массы тела за 3 сут после введения ЦФ.

Введение в желудок NaHCO_3 в два приёма в суммарной дозе, которая для человека эквивалентна 350 мл 4 % раствора, позволило в существенной мере, хотя и не полностью, сохранить пропульсивную функцию желудка. Наиболее эффективным NaHCO_3 был в сроки, не превышавшие значения $T_{1/2}$ ЦФ после внутривенного (в. в.) введения крысам: 0,5 ч [21]. Из этого следует, что в механизме профилактического действия NaHCO_3 преобладало торможение токсификации ЦФ. Учитывая слабощелочную реакцию раствора NaHCO_3 и способность этой соли к резорбции слизистой оболочкой ЖКТ, в профилактический эффект было вовлечено торможение образования акролеина и фосфорамидного иприта в эпителиоцитах желудка и (или) тонкой кишки. На это же указывает неспособность NaHCO_3 предупреждать вызывавшуюся циклофосфаном гипотрофию селезёнки, что можно объяснить буферными свойствами крови, не позволявшими в сопоставимой мере повысить pH клеток стволового или пролиферативного пулов кроветворной системы. Таким образом, защитное действие

NaHCO₃ на ЖКТ было избирательным, что благоприятствует его апробации при заболеваниях, требующих миелоабляционной цитостатической терапии.

Оптимум pH для ферментов, отвечающих за репарацию ДНК, лежит в интервале значений, близких к нейтральным (6,5-7,5), поэтому ацидоз, обусловленный сдвигом от окислительного к гликолитическому фосфориларованию и сопровождающий повреждение ипритами митохондрий [21], может нарушать репарацию ДНК. Ацидоз ведёт и к другому эффекту, способствующему энтероцитопении: экспрессии проапоптотических белков, активирующих каспазы [22]. Это определяет возможность защитного эффекта NaHCO₃ при острой интоксикации не только ЦФ, но и другими цитостатическими агентами алкилирующего действия; данная гипотеза требует дальнейшей проверки.

Вызванный циклофосфаном гастростаз сопровождался повышением экскреции с мочой индикана (калиевой соли индоксилсерной кислоты) — конечного продукта метаболизма в печени индола (окисление в индоксил и его сульфирование), основным источником которого у крыс в условиях эксперимента была реакция, катализируемая триптофаназой кишечной микрофлоры. Это указывает на увеличение при ЖКС массы и (или) метаболической активности кишечной микрофлоры, продуцирующей индол, но не метаболизирующей его; в этом случае неизбежна интенсификация образования в ЖКТ не только индола, но и другого токсичного продукта триптофаназной реакции — аммиака. Вызванное ЦФ повышение экскреции индикана было меньшим, чем увеличение относительной массы желудочного химуса, что, вероятно, связано с низкой резорбирующей способностью желудка в сравнении с кишечником. На фоне введения NaHCO₃ различия в экскреции индикана между интактными и получившими ЦФ животными были незначительными, что характеризует уровень эндотоксемии у последних.

Проблема лечения острого цитостатического желудочно-кишечного мукозита всё ещё далека от своего разрешения. В качестве возможных терапевтических средств рассматривают антиоксиданты, противовоспалительные средства и ингибиторы апоптоза [23]. Однако их доставка в наиболее чувствительный к цитостатическим агентам отдел ЖКТ — тонкую кишку — возможна лишь при отсутствии гастростаза. Поэтому медикаментозному лечению цитостатического мукозита должно предшествовать применение медикаментозных средств его экстренной профилактики. Результаты настоящей работы указывают на перспективность раннего перорального назначения с этой целью ощелачивающих агентов, в частности, гидрокарбоната натрия.

Выводы. 1. Однократное внутривенное введение крысам циклофосфана в дозе, эквивалентной применяемым при миелоабляционном кондиционировании, ведёт к

развитию в течение суток желудочно-кишечного стаза с преобладанием гастростаза и избыточному росту желудочно-кишечной микрофлоры, продуцирующей индол.

2. Введение за 30 мин до и тотчас после циклофосфана в желудок крыс гидрокарбоната натрия в дозе, эквивалентной 350 мл его 4 % раствора для человека, в существенной мере предупреждает формирование гастростаза и избыточный рост желудочно-кишечной микрофлоры.

3. Раннее пероральное назначение гидрокарбоната натрия — перспективный подход к экстренной профилактике гастростаза при миелоабляционной химиотерапии циклофосфаном, создающий необходимое условие для последующего перорального назначения пациентам медикаментозных средств лечения острого цитостатического мукозита тонкой кишки.

4. Представляет интерес апробация представленного выше подхода при миелоабляционной цитостатической терапии не только циклофосфаном, но и другими медикаментозными средствами алкилирующего действия.

Список литературы

1. Шефер Т.В., Ивницкий Ю.Ю., Рейнюк В.Л. Моделирование миелоабляционной цитостатической терапии сопровождается желудочно-кишечным стазом у крыс. *Медицина экстремальных ситуаций*.2022; (1): 51-55.

2. Jacobse J., Mensink H., Eileen M., Kollen W., Bresters D., Bredius R. Long-term aprepitant for nausea and vomiting associated with gastroparesis in hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*.2018; 53(10): 1372-1374.

3. Shivarudraiah M., Patel A., Singh S. Acute severe gastroparesis (mega-stomach), an unusual complication of autologous stem cell transplantat: a case report. *Canc. Res. Stat. Treat*. 2022; 5(3): 584-587.

4. Patel R., Soni M., Soyantar B., Shivangi S., Sutaria S., Saraf M., Goswami D. A clash of quorum sensing vs quorum sensing inhibitors: an overview and risk of resistance. *Arch. Microbiol*.2023; 205(4): 107.

5. Buchholz B. M., Bauer A. J. Membrane Tlr signaling mechanisms in the gastrointestinal tract during sepsis. *Neurogastroenterol. Motility*.2010; (22): 232-245.

6. Chapman M. J., Nguyen N. Q., Deane A. M. Gastrointestinal dysmotility: clinical consequences and management of the critically ill patient. *Gastroenterol. Clin. North Am*.2011; 40(4); 725-739.

7. Grover M., Gianrico F., Stanghellini V. Gastroparesis: a turning point in understanding and treatment. *Gut*.2019; 68(12): 2238-2250.
8. Zheng T., Camilleri M. Management of gastroparesis. *Gastroenterol. Hepatol*.2021; 17(11): 515-525.
9. Sangild P.T., Shen R.L., Pontoppidan P., Rathe M. Animal models of chemotherapy-induced mucositis: translational relevance and challenges. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Tract Liver*.2017; 314(2): 231-246.
10. Anderson L. W., Chen T. L., Colvin O. M., Grochow L. B., Collins J. M., Kennedy M. J. et al. Cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide / aldophosphamide kinetics in patients receiving high-dose cyclophosphamide chemotherapy. *Clin. Cancer. Res*.1996; 2(9): 1481-1487.
11. Kuris G., Ambroziak W., Pietruszko R. Human aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem*.1989; 264(8): 4715-4721.
12. Tieze L., Neumann M., Fischer R., Rajewsky M., Jähde E. Proton-mediated liberation of aldophosphamide from a nontoxic prodrug: a strategy for tumor-selective activation of cytotoxic drug. *Canc. Res*.1989; 49(15): 4179-4184.
13. Шефер Т.В., Рейнюк В.Л., Малаховский В.Н., Ивницкий Ю.Ю. Отягощение острых неврологических расстройств, вызванных циклофосфаном, при искусственном снижении рН химуса у крыс. *Бюл. Эксперим. Биол. Мед*.2012; 153(6): 841-846.
14. Рейнюк В.Л. Шефер Т.В., Краснов К.А., Ивницкий Ю.Ю. Влияние циклофосфана и лактулозы на поступление аммиака и веществ средней молярной массы из кишечника в кровь у крыс. *Бюл. Эксперим Биол. Мед*.2012; 154(10): 455-459.
15. Seydoux C., Medinger M., Gerull S., Halter J., Heim D., Chalandon Y. et al. Busulfan-cyclophosphamide versus cyclophosphamide-busulfan as conditioning regimen before allogeneic hematopoietic cell transplantation: a prospective randomized trial. *Ann. Hematol*.2021; 100(1): 209-216.
16. Мартынов В. Л., Семёнов А. Г., Тулупов А. А., Чесноков А. А., Курилов В. А., Казарина Н. В. Индикан мочи и водородный дыхательный тест как методы скрининг-диагностики синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке. *Мед. Альм*.2017; 2(47): 117-121.
17. Балаховский С. Д., Балаховский И. С. *Методы химического анализа крови*. М.: Медгиз; 1953.
18. Zar J.H. *Biostatistical Analysis*. 5th Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River: 2010.
19. O'Grady J., Murphy C.L., Burry L., Shanahan F., Buckley M. Defining gastrointestinal transit time using video capsule endoscopy: a study of healthy subjects. *Endosc*.

*Int. Open.*2020; 8(3): E396-E400.

20. Yang L., Yan C., Zhang F., Jiang B., Gao S., Liang Y. et al. Effects of ketoconazole on cyclophosphamide metabolism: evaluation of CYP3A4 inhibition effect using the *in vitro* and *in vivo* models. *Exp. Anim.*2018; 67(1): 71-82.

21. Sahu K., Langeh U., Singh C., Singh A. Crosstalk between anticancer drugs and mitochondrial functions. *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.*2021; (2): 100047.

22. Sunil V., Vayas K., Radbel J., Abramova E., Gow A., Laskin J., Laskin D. Impaired energy metabolism and altered functional activity of alveolar type II epithelial cell following exposure of rats to nitrogen mustard. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*2022; 456: 116257.

23. Dahlgren D., Sjöblom M., Hellström P., Lennemäs H. Chemotherapeutics-induced intestinal mucositis: pathophysiology and potential treatment strategies. *Front. Pharmacol.*2021; 12 (Art. 681417): 1-12.