

А. Ф. Висмонт, Л. М. Лобанок

Об участии аргиназы печени в процессах детоксикации и терморегуляции при эндотоксиновой лихорадке
Об участии аргиназы печени в процессах детоксикации и терморегуляции при эндотоксиновой лихорадке

Белорусский государственный медицинский университет, Минск

В экспериментах на крысах и кроликах установлено, что активность аргиназы печени имеет важное значение в процессах детоксикации, формирования тиреоидного статуса и терморегуляторных реакций при действии в организме бактериального эндотоксина.

Ключевые слова: аргиназа печени, детоксикация, терморегуляция, эндотоксиновая лихорадка.

Известно, что от функционального состояния печени во многом зависит выраженность эндотоксинемии [4,6], а также содержание в крови йодсодержащих гормонов щитовидной железы [9,16], имеющих важное значение в процессах детоксикации и терморегуляции [5,11]. Показано, что между процессами детоксикации в печени, активностью системы гипофиз-щитовидная железа и регуляции температуры тела существует тесная взаимосвязь [3,4,5]. В то же время данные о значимости аргиназы печени в регуляции ее детоксикационной функции, в формировании тиреоидного статуса и терморегуляторных реакций организма при бактериальной эндотоксинемии отсутствуют, хотя ее участие в этих процессах вполне закономерно.

Цель работы – установить роль аргиназы печени в регуляции ее детоксикационной функции и температуры тела при эндотоксиновой лихорадке. Материал и методы. Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых крысах и кроликах обоего пола. Все наблюдения производили в термонейтральных условиях (20–22°C). Для создания общепринятой модели эндотоксиновой лихорадки использовали эндотоксин *E. Coli* (серия 0111:B4 Sigma, США), который вводили однократно: крысам – внутривенно в дозе 5 мкг/кг, кроликам – в краевую вену уха в дозе 0,5 мкг/кг. Для выяснения роли аргиназы печени и монооксида азота (NO) в процессах детоксикации и регуляции температуры тела использовали ингибитор аргиназы N ω -гидроксинор-L-аргинин (nor NOHA) фирмы BACHEM (Германия) и неселективный блокатор NO-синтазы – метиловый эфир NG-нитро-L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США). Nor NOHA в дозе 10 мг/кг вводили крысам внутривенно ежедневно в течение недели. L-NAME в дозе 25 мг/кг вводили однократно: кроликам – внутривенно, крысам – внутривенно.

Продукцию NO оценивали по суммарному уровню нитратов/нитритов (NO $_3^-$ /NO $_2^-$) в плазме крови [10,12]. Концентрацию мочевины определяли колориметрически по цветной реакции с диацетилмонооксимом, а активность аргиназы в печени – спектрофотометрически [15]. О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), степени токсичности крови (СТК) и содержанию в

плазме крови «средних молекул» (СМ). ПНС (гексенал 100 мг/кг, внутривенно) оценивали по времени нахождения животных на боку [7]. Определение содержания в крови СМ проводили методом, разработанным В.М. Моиним с соавт. [2], СТК способом, предложенным О.А. Радьковой и соавт. [1]. Уровень в плазме крови трийодтиронина (Т3) и тетраiodтиронина (Т4) определяли радиоиммунным методом с помощью тест-наборов ХОП ИБОХ НАН Беларуси. У крыс и кроликов температуру кожи, как и ректальную температуру (в прямой кишке на глубине 3,0 и 5,0 см соответственно) измеряли с помощью электротермометров ТПЭМ-1 и Microlife (Швейцария). Все полученные цифровые данные обработаны общепринятыми методами вариационной биологической статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В опытах установлено, что внутривенное введение крысам (n=12) бактериального эндотоксина (ЛПС) в дозе 5,0 мкг/кг приводит к медленному повышению температуры тела и слабо выраженной гипертермии. 0,001) через<Температура тела повышалась на 1,3°C, 1,2°C, 1,8°C 1,2°C и 0,7°C (p 120, 180, 240, 300 и 330 мин. после инъекции эндотоксина и составляла 38,9±0,11; 38,8±0,12; 39,4±0,10; 38,8±0,13 и 38,3±0,12°C соответственно. Введение в кровяное русло ЛПС (0,5 мкг/кг) кроликам (n=9) приводило к быстрому и значительному повышению ректальной температуры. Температура тела у животных через 30, 60, 120 и 180 мин. после введения ЛПС возрастала на 0,6°C, 1,3°C, 1,6°C и 1,2°C 0,001) и составляла соответственно 39,2±0,12; 39,9±0,10; 40,2±0,11 и<(p 39,8±0,12°C.

Действие ЛПС у крыс (n=8) через 120, 180, 240, 300 и 330 мин после введения экзопирогена приводило к повышению активности аргиназы в печени на 53,1%, 39,2%, 31,3%, 27,8% и 23,3% (p<0,05) соответственно, по сравнению с контролем. Активность аргиназы в печени у крыс контрольной группы через 120, 180, 240, 300 и 330 мин после внутривенного введения физраствора составляла 5,63±0,27 (n=8), 5,04±0,22 (n=7), 5,26±0,31 (n=7), 5,47±0,33 (n=7) и 5,38±0,29 (n=7) мкмоль мочевины/г ткани•ч. Содержание NO₃⁻/NO₂⁻ в плазме крови у крыс (n=7) в этих условиях по сравнению с контролем возрастало на 20,8%, 21,5%, 48,7%, 62,5% и 81,2% (p<0,05) и составляло соответственно 8,7±0,25; 9,0±0,36; 10,6±0,41, 12,0±0,58 и 13,1±0,52 мкмоль/л.

Установлено, что на высоте эндотоксической лихорадки в плазме крови у крыс (n=7) через 180, 240, 300 и 330 мин. после инъекции ЛПС уровень СМ повышается на 17%, 23,1%, 20,5% и 19,8% (p<0,05). Токсичность плазмы при этом достоверно не изменялась. ПНС у крыс (через 120, 180, 240 и 330 мин. после внутривенного введения ЛПС) уменьшалась (по сравнению с животными контрольной группы - внутривенное введение физраствора) на 23,0%, 25,2%, 28,7% и 20,8% (p<0,05) и составляла соответственно 22,0±3,4, 21,1±3,0, 20,0±3,2 и 22,5±3,5 мин. Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС у животных в контроле (через 180 мин после внутривенного введения физраствора, n=7) составили соответственно 0,70±0,012 г/л, 1,3±0,11 и 27,9±3,12 мин. Уровень мочевины в крови у крыс (n=7) через 120, 180, 240, 300 и 330 мин после внутривенного введения экзопирогена повышался (по сравнению с

контролем) на 26,0%, 30,7%, 44,7%, 51,4% и 39,8% ($p < 0,05$) и составлял $4,4 \pm 0,50$, $5,1 \pm 0,60$, $5,6 \pm 0,57$, $6,9 \pm 0,57$ и $5,2 \pm 0,43$ мМоль/л.

Обнаружено, что в условиях эндотоксической лихорадки, через 120, 180, 240 и 330 мин после инъекции ЛПС, в плазме крови крыс ($n=7$) снижается уровень Т3 на 28,2% ($p < 0,05$), 31,2% ($p < 0,05$), 35,3% ($p < 0,05$) и 26,6% ($p < 0,05$) и повышается содержание Т4 на 23,8% ($p < 0,05$), 25,2% ($p < 0,05$), 31,3% ($p < 0,05$) и 22,1% ($p < 0,05$). Концентрация Т3 и Т4 в плазме крови у животных контрольной группы ($n=7$) через 120, 180, 240 и 330 мин после внутрибрюшинного введения бидистиллированной воды составляла $1,4 \pm 0,15$ и $56,7 \pm 3,22$, $1,3 \pm 0,14$ и $54,3 \pm 3,11$, $1,5 \pm 0,11$ и $55,1 \pm 3,25$, $1,4 \pm 0,12$ и $51,8 \pm 2,98$ нМоль/л соответственно.

В опытах на крысах установлено, что через 20 дней после ежедневного интрагастрального введения на 1%-ном крахмальном растворе синтетического гормона трийодтиронина гидрохлорида (Lyothyronine "Berlin-Chemie", Германия), в дозе 30 мкг/кг, концентрация в плазме крови Т3 у животных увеличивалась с $1,3 \pm 0,15$ до $2,0 \pm 0,27$ нМоль/л (на 53,8%, $p < 0,05$, $n=7$), а Т4 снижалась с $52,4 \pm 4,11$ до $40,8 \pm 3,51$ нМоль/л (на 12,2%, $p < 0,05$, $n=7$). У гипертиреозидных крыс ($n=7$) в 0,05) и детоксикационная функция печени повышалась температура тела (на $0,7^\circ\text{C}$, $p < 0,05$), ПНС снижалась на 26,4% ($p < 0,05$, $n=7$) и составляла $20,6 \pm 2,4$ мин. Содержание СМ в плазме крови снижалось на 22,8% ($p < 0,05$, $n=7$), а СТК уменьшалась на 19,8% ($p < 0,05$, $n=7$). При этом активность аргиназы печени повышалась на 41,3% ($p < 0,05$, $n=7$) и составляла $7,4 \pm 0,33$ мкМоль мочевины/г ткани•ч.

У гипотиреозидных крыс наблюдалось снижение температуры тела, концентрации йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови, активности аргиназы и детоксикационной функции печени. Так, до начала введения на 1%-ном растворе крахмала тиреостатика мерказолила (НПО «Укрмедпрепараты», Украина) в дозе 25 мг/кг ректальная температура у крыс опытной группы составляла $37,6 \pm 0,11$ °C ($n=8$), а через 20 дней его применения снижалась на $0,8^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$). У животных контрольной группы, получавших интрагастрально 1% раствор крахмала ректальная температура была равной $37,5 \pm 0,12^\circ\text{C}$ ($n=7$). Понижение температуры тела у животных с экспериментальным гипотиреозом сопровождалось снижением активности детоксикационной функции печени. Так, ПНС у крыс увеличивалась на 28,1% ($p < 0,05$, $n=7$) и составляла $31,6 \pm 2,85$ мин. Содержание в плазме крови гипотиреозидных крыс СМ возрастало на 19,1% ($p < 0,05$, $n=6$), а СТК в этих условиях увеличивалась на 17,4% ($p < 0,05$, $n=7$). Наряду со снижением температуры тела, у гипотиреозидных крыс имело место снижение активности аргиназы печени на 26,6% ($p < 0,05$, $n=7$). У крыс ($n=7$) контрольной группы (через 20 дней ежедневного интрагастрального введения 1% раствора крахмала) она составляла $3,9 \pm 0,31$ мкМоль мочевины/г ткани•ч.

Известно, что аргиназа печени является важным ферментом цикла мочевины, участвующей в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии [17]. Исследования, выполненные на кроликах ($n=7$) и крысах ($n=8$) показали, что однократное введение, соответственно в кровоток или внутрибрюшинно, интактным животным 30%-ного раствора мочевины (Carl Roth GmbH+Co.KG) в дозе 300 мг/кг не влияет на температуру тела. Установлено, что действие ЛПС

(5 мкг/кг) у крыс в условиях предварительного введения животным мочевины в дозе 300 мг/кг (внутрибрюшинно один раз в сутки в течение трех дней) сопровождается ослаблением лихорадочной реакции. Так, через 120 и 180 мин после инъекции, ректальная температура у крыс (n=8), получивших только ЛПС, повышалась на 1,2 и 1,1°C, в то время как у животных (n=10), которые получили ЛПС в условиях действия мочевины, наблюдалось повышение температуры тела в указанные промежутки времени после введения эндотоксина всего лишь на 0,6 и 0,4°C. В опытах на кроликах показано, что введение в кровотоки мочевины (0,3 г/кг) на высоте подъема температуры тела при эндотоксиновой лихорадке (через 60 и 90 мин от момента инъекции ЛПС) приводит к значительному понижению температуры тела и ослаблению лихорадки. Так, через 15 и 30 мин после введения мочевины ректальная температура на высоте лихорадки (60 мин) снижалась по сравнению с контролем на $0,9 \pm 0,08$ ($p < 0,05$) и $0,8 \pm 0,10$ оС ($p < 0,05$). В опытах на кроликах (n=7) показано, что лихорадочная реакция, вызванная введением ЛПС, также ослабляется в условиях предварительного введения (за 30 мин до введения экзопирогена) в кровотоки животных мочевины (0,3 г/кг).

Учитывая данные литературы о том, что активность аргиназы печени сказывается на процессах образования NO и тонусе сосудов [13,14], а действие в организме ЛПС вызывает экспрессию индуцибельной NO-синтазы и приводит к образованию больших количеств NO [8,18], представляло интерес выяснить, как будет изменяться детоксикационная функция печени и температура тела животных при действии ЛПС в условиях предварительного введения в их организм веществ, угнетающих активность L-аргинин-NO-системы.

В экспериментах на крысах установлено, что действие ЛПС в условиях предварительного введения в организм лабораторных животных L-NAME сопровождалось ослаблением лихорадочной реакции (см. рис. 1).

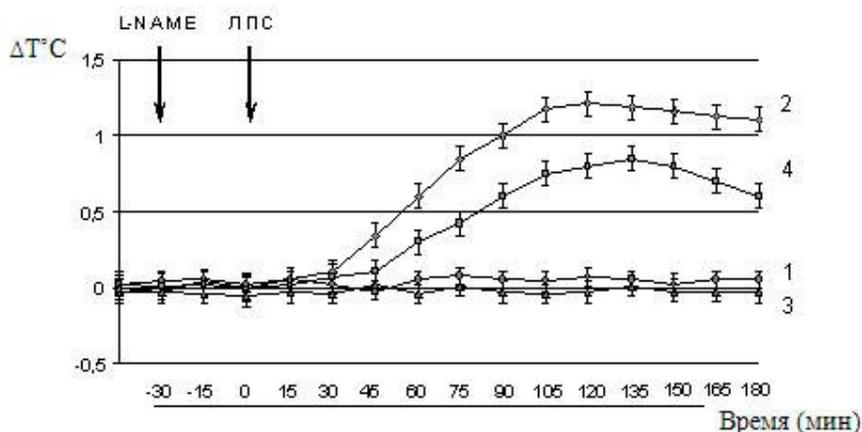


Рис. 1. Изменение ректальной температуры у крыс после внутрибрюшинного введения: 1 – физ. раствора, 2 – ЛПС (5 мкг/кг), 3 – L-NAME (25 мг/кг), 4 – ЛПС (5 мкг/кг) в условиях действия L-NAME (25 мг/кг).

Стрелка – момент введения препаратов

Количество животных в каждой группе – 9

Так, ректальная температура у крыс (n=9), получивших только ЛПС повышалась

на 1,2°C и 1,1°C через 120 и 180 мин. после инъекции, в то время как у животных (n=9), которые получили ЛПС в условиях действия L-NAME наблюдалось повышение температуры в указанные промежутки времени после введения эндотоксина всего лишь на 0,8°C и 0,6°C. В опытах на кроликах (n=8) показано что, через 120 мин после инъекции ЛПС, в условиях предварительного (за 30 минут до инъекции эндотоксина) введения в кровоток L-NAME ректальная температура повышалась с 0,13°C, в то время как у животных контрольной группы (n=7) с $\pm 0,12^\circ\text{C}$ до $39,9 \pm 38,8$ $0,20^\circ\text{C} \pm 0,10^\circ\text{C}$ до $40,3 \pm 38,7$

Установлено, что предварительное введение в организм животных ингибитора синтеза NO не только ослабляет лихорадочную реакцию на действие эндотоксина, но и способствует значительному повышению уровня мочевины в крови, а также препятствует активации детоксикационной функции печени и системы гипофиз – щитовидная железа в этих условиях.

Так, ПНС через 120 мин. после внутрибрюшинного введения ЛПС у крыс (n=7), предварительно получавших L-NAME, за 30 мин. до введения эндотоксина, по сравнению с животными контрольной группы (действие только ЛПС), увеличивалась на 21,7% (p<2,57 мин. Уровень мочевины и концентрация $\text{CM} \pm 0,05$) и составляла 26,8 в плазме крови в этих условиях повышались на 41,5% (p<0,05) и 27,7% (p<0,05), а показатель токсичности крови был выше у опытных крыс по сравнению с таковым в контроле (действие только ЛПС) на 13,9% (p<0,05) через 120 мин. после инъекции экзопирогена.

Обнаружено, что действие эндотоксина через 120 и 180 мин. после инъекции, в условиях угнетения активности NO-синтазы, сопровождается более выраженным снижением уровня T3 (на 20,7% и 19,1%, p<0,05) и снижением, а не повышением как при действии ЛПС, уровня T4 в плазме крови на 31,8% (p<0,05) и 37,2% (p<0,05), соответственно, по сравнению с действием ЛПС.

В опытах на крысах (n = 8) также установлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение *por*-NOHA в дозе 10 мг/кг в течение недели достоверно не сказывается на ректальной температуре и приводит к снижению активности аргиназы печени на 0,05). У животных <0,05) и уровня мочевины в крови на 51,3% (p<71,2% (p контрольной группы, получавших ежедневно внутрибрюшинно физраствор в течение недели, активность аргиназы печени и концентрация мочевины в крови составляла соответственно $5,7 \pm 0,51$ мкмоль мочевины/г ткани•ч (n=7) и $3,6 \pm 0,21$ мМоль/л (n=7).

В опытах на крысах установлено, что лихорадочная реакция на внутрибрюшинное введение ЛПС ослабляется предварительным ежедневным внутрибрюшинным введением (до инъекции ЛПС в течение 7 дней) раствора *por*-NOHA в дозе 10 мг/кг. Так, температура тела у крыс в контроле (через 7 дней после ежедневного внутрибрюшинного введения 1,0 мл физраствора) под влиянием внутрибрюшинного введения ЛПС (5,0 мкг/кг) через 120 и 180 мин от начала инъекции эндотоксина повышалась на $1,2 \pm 0,14$ °C (n=10) и $1,1 \pm 0,11$ °C (n=10) соответственно, а в условиях действия *por*-NOHA через 2 и 3 ч после введения ЛПС – на $0,4 \pm 0,06$ и $0,3 \pm 0,02$ °C (n=8). Температура кожи корня хвоста у крыс под влиянием внутрибрюшинного введения ЛПС (через 120 мин после инъекции) в условиях действия *por*-NOHA снижалась с $22,9 \pm 0,29$ до $21,3 \pm 0,31$ °C (n=8), а у животных в контроле (ежедневное внутрибрюшинное

введение физраствора в течение 7 дней и последующая однократная инъекция ЛПС) – с $23,1 \pm 0,31$ до $17,2 \pm 0,37^\circ\text{C}$ ($n=8$), соответственно.

В опытах на крысах ($n=7$) установлено, что действие ЛПС ($5,0$ мкг/кг) через 120 мин после инъекции экзопирогена, в условиях предварительного угнетения активности аргиназы печени сопровождалось более значительным возрастанием (по сравнению с животными в контрольной группе) СТК, концентрации СМ и Т4 в плазме крови. Содержание Т3 в плазме крови в этих условиях (по отношению к животным в контроле - получавших физраствор и ЛПС) значительно снижалось (на $47,1\%$, $p<0,05$), а ПНС повышалась на $24,5\%$ ($p<0,05$). Установлено, что через 120 и 180 мин после инъекции ЛПС в условиях действия в организме животных *por*-НОНА содержание $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови повышается по сравнению с контролем (действие только одного эндотоксина) на $71,1\%$ ($p<0,05$) и $102,5\%$ ($p<0,05$) соответственно. Выявлено, что действие ЛПС в организме у крыс ($n=7$) предварительно получивших внутрибрюшинно *por*-НОНА, сопровождается менее значимым повышением уровня мочевины в крови. Так, через 120 и 180 мин после инъекции ЛПС (5 мкг/кг) действие бактериального эндотоксина в организме опытных животных сопровождалось повышением уровня мочевины на $19,1\%$ ($P<0,05$) и $13,2\%$ ($P<0,05$) соответственно. У животных контрольной группы ($n=7$), получивших физраствор и ЛПС, уровень мочевины в плазме крови возрастал на $26,0\%$ ($p<0,05$) и $30,7\%$ ($p<0,05$) и составлял соответственно $4,4 \pm 0,50$ и $5,0 \pm 0,57$ ммоль/л.

Заключение

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что активность детоксикационной функции печени, формирование тиреоидного статуса и терморегуляторных реакций при действии бактериальных эндотоксинов у крыс и кроликов зависят от активности аргиназы печени, состояния L-аргинин-НО-системы и уровня мочевины в крови. Очевидно, аргиназу печени, мочевину плазмы крови и NO можно рассматривать как важнейшие взаимосвязанные факторы, участвующие в регуляции процессов теплообмена и детоксикации при бактериальной эндотоксинемии, сопровождающейся лихорадкой.

Выводы

1. Аргиназа печени участвует в процессах детоксикации, формирования тиреоидного статуса и терморегуляторных реакций при действии в организме бактериального эндотоксина. Развитие лихорадки у крыс в условиях действия в организме ингибитора аргиназы *por*-НОНА, сопровождается менее выраженными изменениями в процессах детоксикации, уровня мочевины, Т3 в плазме крови и не столь значительным подъемом температуры тела.
2. Тиреоидный статус организма влияет на активность аргиназы печени, процессов детоксикации и температуру тела. У гипертиреоидных крыс повышается, а у гипотиреоидных – снижается активность аргиназы печени, процессов детоксикации и температура тела.

Литература

1. А.с. 1146570 СССР, МКИ б О1 № 1/28. Способ определения токсичности биологических жидкостей / О. А. Радькова [и др.]. №3458007/28-13; заявлено

- 18.06.84; опубл. 23.03.85. Бюл. №11 // Открытия. Изобретения. 1985. № 11. С. 616.
2. А.с. 1520445 СССР, VRB F 01 № 33/50. Способ определения веществ группы средних молекул в биологических жидкостях / В. М. Моин [и др.]. №4323421/28-14; заявлено 02.11.87; опубл. 07.11.89. Бюл. №41 // Открытия. Изобретения. 1987. № 41. С. 415.
 3. Висмонт, Ф. И. Зависимость терморегуляции от состояния детоксикационной функции печени и выраженности эндотоксинемии // Нейрогуморальные механизмы регуляции функции в норме и патологии / Отв. ред. В. Н. Гурин. Минск, 2007. С. 54–58.
 4. Висмонт, Ф. И. Эндотоксинемия и дизрегуляторная патология / Ф. И. Висмонт, А. Ф. Висмонт // Новости мед.-биол. наук. 2008. № 1–2. С. 41–46.
 5. Степанова, Н. А. О роли монооксида азота в регуляции функции щитовидной железы, детоксикационной функции печени и температуры тела при эндотоксиновой лихорадке / Н. А. Степанова, Ф. И. Висмонт // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2003. № 1. С. 36–41.
 6. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени: обзор / Д. Н. Маянский // Пат. физиология. 1985. № 4. С. 80–86.
 7. Парк, Д. В. Биохимия чужеродных соединений / Д. В. Парк. М.: Медицина, 1973. 287с.
 8. Тэйлор, Б. С. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции / Б. С. Тэйлор, Л. Х. Аларсон, Т. Р. Биллиар // Биохимия. 1998. Т. 63, № 7. С. 905–923.
 9. Фабри, З. П. Функциональная активность щитовидной железы и распределение ее гормонов в периферических тканях при экспериментальном поражении печени / З. П. Фабри, А. Е. Пащенко, И. П. Заячук // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57, № 2. С. 84–87.
 10. Bryan, N. S. Method to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples / N. S. Bryan, M. B. Grisham // Free Radic. Biol. Med. 2007. Vol. 43, № 5. P. 645–657.
 11. Clark, W. G. Brain and pituitary peptides in thermoregulation / W. G. Clark, J. M. Lipton // Pharmacol. Ther. 1983. Vol. 22, № 1. P. 249–297.
 12. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction / I. Guevara [et al.] // Clin. Chim. Acta. 1998. Vol. 274, n 2. P. 177–188.
 13. Durante, W. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function / W. Durante, F. K. Johnson, R. A. Johnson // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2007. Vol. 34, № 9. P. 906–911.
 14. Getz, G. S. Arginine/Arginase NO NO NO // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 2006. Vol. 26. P. 237–240.
 15. Geyer, J. W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J. W. Geyer, D. Dabich // Anal. Biochem. 1971. Vol. 39, № 2. P. 412–417.
 16. Kelly, G. S. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review / G. S. Kelly // Altern. med. rev. 2000. № 4. P. 306–333.
 17. Scibior, D. Arginine – metabolism and functions in the human organism / D. Scibior, H. Czeczot // Postepy Hig. Med. Dosw. 2004. Vol 58. P. 321–332.

18. Wettstein, M. Endotoxin-induced nitric oxide synthesis in the perfused rat liver: effects of L-arginine and ammonium chloride / M. Wettstein // *Hepatology*. 1994. Vol. 19, № 3. P. 641–647.