

Пробиотики и воспалительные заболевания кишечника

М.Ф.Осипенко, М.И.Скалинская, А.А.Размерица

ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это хронические заболевания, поражающие желудочно-кишечный тракт, основные формы которых представлены болезнью Крона и язвенным колитом. Этиология до сих пор неизвестна, хотя несколько факторов были определены в качестве значимых в их развитии. Среди них важное место занимает микрофлора кишечника, роль которой в последние годы пересмотрена. Деликатные симбиотические отношения между микрофлорой кишечника и «хозяином» при ВЗК меняются [16].

В последние годы проведено большое количество исследований для оценки роли пре- и пробиотиков в модуляции кишечной микрофлоры при разных состояниях (более частое определение – «микробиота»), которая включает в себя бактерии, грибки, бактериофаги и вирусы и действует как «орган» синергически с «хозяином», создавая самостоятельную сложную экосистему [30, 33].

Особенности микрофлоры у пациентов с ВЗК

Изучено, по крайней мере, 400 видов бактерий кишечной микрофлоры, которая значительно различается у больных с ВЗК и у здоровых. Ранее проведенные исследования продемонстрировали снижение числа лакто- и бифидобактерий при активных формах ВЗК и нормализацию этих показателей в случаях ремиссии. У пациентов с ВЗК выявляется уменьшение количества синантропных бактерий, таких как *Firmicutes*, *Clostridium* подвидов IX, IV и бактероидов, вместе с тем возрастает число протео- и актинобактерий [9, 30, 33].

Отмечается уменьшение уровня короткоцепочечных жирных кислот в кале пациентов с ВЗК. Снижение уровня бутирата вполне может быть связано с воспалением в кишке, поскольку эта разновидность короткоцепочечных жирных кислот отвечает за ингибирование синтеза провоспалительных цитокинов и увеличение продукции муцина и антимикробных пептидов, а также за обеспечение энтероцитов энергетическим субстратом [10].

Уменьшение количества подвидов *Faecalibacterium* ведет к снижению их противовоспалительного защитного воздействия. В исследовании, проведенном M.Joossens и соавт., при анализе фекальной микробиоты у 68 пациентов с болезнью Крона и 84 близких родственников этих больных было отмечено снижение *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* и *Clostridium* кластеров XI и IV с одновременным увеличением количества *Ruminococcus*. При этом выявлены значительные отличия в составе кишечной микробиоты между пациентами с болезнью Крона и у их родных, несмотря на общие пищевые привычки [18].

У пациентов с язвенным колитом, включая паучиты (воспаление созданного хирургическим путем тонкокишечного резервуара после резекции толстой кишки), одновременно с выявленным снижением *Faecalibacterium* обнаружено значимое преобладание протеобактерий (*Proteobacteria*) и более высокий уровень сульфатредуцирующих бактерий, которые, влияя на увеличение продукции сероводорода, опосредованно снижают выработку бутирата, а также потенцируют клеточную пролиферацию [10, 15].

Исследование, проведенное B.Willing и соавт., показало, что у пациентов с илеоцекальной локализацией

болезни Крона недостаточно представлены такие подвиды, как *Faecalibacterium* и *Roseburia*, в то время как возрастает количество *Enterobacter*, в частности кишечной палочки и штаммов *Ruminococcus gnavus* [35].

У пациентов с язвенным колитом выявлена избыточная контаминация толстой кишки видом *Fusobacterium*, а также *Escherichia coli*, что может свидетельствовать об их вкладе в течение заболевания. В биоптатах слизистой оболочки толстой кишки многих пациентов с болезнью Крона изолируется *E. coli*, в частности адгезивно-инвазивные штаммы [11].

Роль микрофлоры в патогенезе ВЗК

В первые годы жизни микрофлора кишечника «запускает» иннантный (неспецифический) иммунитет посредством стимулирования лимфоидной системы кишечника. В результате местных и системных иммунных реакций формируется приобретенный иммунитет. В нормальных условиях стимуляция иммунной системы слизистой оболочки посредством кишечной микрофлоры определяет состояние физиологического воспаления низкой активности, что продолжает активацию иммунной системы.

Гомеостаз слизистой оболочки нуждается в балансе про- и противовоспалительных компонентов. В последние годы выполнены исследования, продемонстрировавшие взаимосвязь между нарушением этого баланса и наличием разных заболеваний, связанных с изменением иммунного статуса: ожирением, аллергией, аутоиммунными заболеваниями, синдромом раздраженного кишечника, ВЗК. Ранее высказывались гипотезы, что развитие ВЗК зависит от конкретного патогенного штамма бактерий. В 1984 г. R.Chiodini и соавт. показали взаимосвязь наличия *Mycobacterium avium* с развитием болезни Крона, которая впоследствии не была подтверждена [12].

Одна из основных гипотез патогенеза ВЗК – чрезмерный иммунный ответ на эндогенные бактерии у генетически предрасположенных лиц. Кишечник – область высокой концентрации микробиоты, поэтому аномальное взаимодействие между иммунной системой слизистой кишки и микрофлорой приводит к изменению иммунологической функции и вызывает воспалительную реакцию: либо конкретный патогенный инфекционный агент индуцирует аномальный воспалительный ответ слизистой кишки, либо антигены микрофлоры кишки, проникающие через нарушенный барьер слизистой оболочки в собственную пластинку слизистой, вызывают аномальный иммунный ответ [17, 26].

Триггерным фактором развития воспаления является секреция патогенными/условно-патогенными микроорганизмами энтеротоксинов, которые усиливают проницаемость эпителиального барьера кишки, приводят к нарушению клеточного метаболизма эпителия. Доказано, что покровный кишечный эпителий зависит от масляной кислоты (бутирата), которая является основным источником энергии для энтероцитов [5].

В качестве триггеров болезни Крона рассматриваются иерсинии, псевдомонады, сальмонеллы, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile* и микоплазма. Все эти агенты в ходе многочисленных исследований были идентифицированы в качестве факторов, связан-

ных с рецидивированием болезни Крона, но причастность их к индукции заболевания на сегодняшний день не имеет убедительных доказательств.

Значение грибковой флоры при ВЗК пока неясно. Отправной точкой для размышлений о роли грибов в патогенезе ВЗК послужили нахождение антител у пациентов с болезнью Крона к *Saccharomyces cerevisiae*, большая контаминация грибковой флорой, а именно *Candida*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, по сравнению с контролем. Тем не менее необходимы дополнительные исследования для определения значения грибковой флоры как триггерного механизма развития ВЗК, поскольку их рост может быть следствием изменения состава микрофлоры под влиянием воспаления либо антибактериальной терапии.

C. difficile и ВЗК

Согласно последним рекомендациям Европейского общества по изучению болезни Крона и язвенного колита (ЕССО) ВЗК являются независимым фактором развития инфекции *C. difficile* в кишечнике, вызывающей диарею и тяжелый, в том числе и псевдомембранозный, колит. Пациенты с язвенным колитом особенно восприимчивы к данной инфекции, и ее возникновение у больных с ВЗК резко утяжеляет течение заболевания, требует госпитализации и приводит к повышенной летальности [23].

В обсервационном ретроспективном исследовании в США показана частота *C. difficile* при ВЗК, которая колеблется от 1,8 до 4,6%. Отношение шансов кластридиальной инфекции в группе больных с ВЗК составляет 2,9 (95% доверительный интервал – ДИ 2,1–4,1) по сравнению с группой лиц без ВЗК. Наиболее высок риск данной инфекции у пациентов с язвенным колитом [31].

Исследования показали и больший риск госпитализации из-за кластридиальной инфекции, который воз-

растает год от года. Так, для больных с язвенным колитом частота госпитализации составила 24 на 1 тыс. человек в 1998 г. и 39 на 1 тыс. в 2004 г., для болезни Крона соответственно 8 на 1 тыс. и 12 на 1 тыс. Одновременно возрастали сроки госпитализации и летальность (в 4 раза) [4].

Пробиотики и ВЗК

Большинство обычных методов лечения ВЗК направлено на модулирование иммунной системы. Для терапии этих заболеваний используются соединения 5-аминосалициловой кислоты, кортикостероиды, азатиоприн/6-меркаптопурин, метотрексат, циклоспорин, антитела к фактору некроза опухоли и другая биологическая терапия.

Предполагая, что микрофлора играет определенную роль в патогенезе ВЗК, ряд воздействий может быть направлен на модуляцию микробиоты кишечника. Этот эффект достигают несколькими путями: антибиотикотерапией, назначением про- и пребиотиков, изменением характера диеты. Антибактериальные препараты особенно эффективны при перипанальной и послеоперационной болезни Крона, наличии паучитов [34].

Логично предположить, что пробиотики, которые содержат жизнеспособные организмы, играющие роль в патогенезе ВЗК, могут оказать положительное воздействие на кишечную микробиоту и течение заболевания. Наиболее часто из пробиотиков используют препараты, содержащие лакто-, бифидобактерии и дрожжи, которые достигают кишечника в неизменном виде. Механизмы их действия до конца не изучены. Вероятно, это связано со способностью влиять на проницаемость мембран, модулировать иммунную систему слизистой оболочки, защищать поверхность слизистой оболочки кишки от патогенных микроорганизмов. Лакто- и бифидобактерии производят вещества, отрицательно воздействующие на грамположительные и грамотри-

цательные бактерии, а также конкурируют с некоторыми патогенными микроорганизмами в клеточной адгезии (например, бактероидами, клостридиями, стафилококками, энтеробактером) [1, 2, 15, 20].

Пребиотики, которые включают неперевариваемые олигосахариды, такие как фрукто-, галактоолигосахариды, лактулозу и инулин, обладают потенциалом для стимуляции роста селективных и полезных кишечных бактерий, увеличивая производство жирных кислот, и могут стимулировать производство цитокинов в слизистой кишечника путем модуляции состава кишечной флоры [24].

Положительные результаты получены при использовании *Saccharomyces boulardii* для поддержания ремиссии, более всего у пациентов с болезнью Крона, в меньшей степени – при обострениях язвенного колита, что показано в исследованиях M.Guslandi и соавт., E.Garcia Vilela и соавт. [24, 29, 34].

Исследование, проведенное Dalmasso и соавт. в 2006 г., продемонстрировало предотвращение развития воспаления и уменьшение клинических признаков язвенного колита при применении *S. boulardii*, что связано со снижением активности ядерного фактора κB (NF-κB) в слизистой кишки и уменьшением общего количества провоспалительных цитокинов. Белки, секретируемые *S. boulardii*, ингибируют продуцирование провоспалительных цитокинов путем уменьшения активности основного медиатора воспаления NF-κB и модулирования активности митогенактивируемых протеинкиназ ERK1/2 и p38. *S. boulardii*, вероятно, реализует свои противовоспалительные эффекты, активируя экспрессию PPAR-γ, подавляя избыточный бактериальный рост микрофлоры в тонкой кишке, потенцируя синтез протеазы клетками «хозяина», которая может расщеплять токсины *C. difficile*, и стимулируя продукцию антител против токсина A *C. difficile* [20, 29, 32].

В ряде исследований продемонстрировали свою эффективность и некоторые другие виды микроорганизмов. Так, *Lactobacillus acidophilus*, по результатам исследования A.Borthakur (2013 г.), доказал свою пробиотическую активность путем противодействия индукции Vcl-10-зависимой NF-κB активации интерлейкина-8 в эпителиоцитах у пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом [6, 29].

У пациентов с язвенным колитом продемонстрирована относительная эффективность комбинированного пре- и пробиотического препарата VSL#3 (*Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) [8].

H.Cui и соавт. показали эффективность бифидопрепарата Bifico в предотвращении обострений язвенного колита [13].

В 2007 г. P.Mallon и соавт. при анализе Кохрановской базы данных пришли к выводу, что пробиотики могут обеспечить эффективность в поддержании ремиссии у пациентов с легким течением язвенного колита. Fujimoto и соавт. определили улучшение качества жизни у больных с язвенным колитом, которые принимали комбинацию «пребиотик + *B. longum*» по всем шкалам ($p=0,03$) [21].

В ЕССО говорится, что существует достаточно доказательств, чтобы поддержать использование энтеральных пищевых добавок, *S. boulardii*, *E. coli Nissle 1917* в лечении ВЗК [19, 23, 27].

Однако в большом количестве исследований не было продемонстрировано убедительного эффекта в лечении и поддержании ремиссии у больных с ВЗК при назначении пробиотиков. Связано ли это только с видом микроорганизмов или другими факторами, пока до конца неясно [29].

Во всяком случае изучение влияния пробиотиков на течение ВЗК продолжается.

Пробиотики, ВЗК и *C. difficile*

В связи с высокой частотой клостридиальной инфекции у больных с ВЗК вопросы ее лечения и профи-

лактики занимают особое место. Так, в профилактических целях рекомендовано строгое выполнение гигиенических процедур, которые включают механическое удаление спор с помощью мыла и тщательного мытья рук и мест общего пользования.

Больные с выявленной клостридиальной инфекцией должны быть изолированы. Метаанализ L.McFarland показал эффективность *S. boulardii* в профилактике и лечении рецидивирующей клостридиальной инфекции [22].

Основными подходами к терапии клостридиальной инфекции является назначение ванкомицина и метронидазола. В целом применение пробиотиков является одним из многообещающих направлений превенции и лечения инфекции *C. difficile*. Метаанализ 6 рандомизированных контролируемых исследований с применением разных пробиотиков, включающих и *S. boulardii*, продемонстрировал значительную эффективность данных штаммов для предотвращения инфекции *C. difficile* в случае использования последних совместно с ванкомицином или метронидазолом (относительный риск 0,59; 95% ДИ 0,41–0,85; $p=0,005$) [9]. В работах C.Surawicz (2000 г.) и L.McFarland (2006 г.) продемонстрировано, что назначение высоких доз ванкомицина в сочетании с *S. boulardii* приводило к значительному снижению рецидивов клостридиальной инфекции по сравнению с пациентами, которые получали только высокодозную терапию ванкомицином [32].

Значение влияния микробиоты при ВЗК также поддерживается исследованиями, в которых отмечается эффект от фекальной трансплантации, успешно используемой при тяжелой инфекции *C. difficile*, в клинических исследованиях у больных с язвенным колитом.

Значение *S. boulardii*

Результаты проведенных в мире исследований довольно противоречивы, но, поскольку слизистая кишки благодаря микрофлоре участвует в регуляции врожденного, поддержании приобретенного иммунитета, обеспечивает кишечный барьер, можно сделать вывод, что микробиом играет важную роль в защитной функции слизистой. Полученные результаты многих исследований подтверждают гипотезу о том, что микрофлора кишечника имеет большое значение для патогенеза ВЗК.

Назначение пробиотиков может помочь восстановить микробный гомеостаз в кишечнике и уменьшить воспаление.

Терапевтическое действие пробиотиков при ВЗК можно объяснить следующими моментами:

- 1) приостановкой роста патогенных микроорганизмов;
- 2) увеличением плотности эпителиальных контактов и снижением проницаемости кишечной стенки;
- 3) модулированием иммунного ответа кишечного эпителия и клеток иммунной системы слизистой кишки;
- 4) секрецией антимикробных продуктов, короткоцепочечных жирных кислот, в частности бутирата, который ингибирует синтез провоспалительных цитокинов и стимулирует синтез антимикробных пептидов.

Одним из наиболее изученных пробиотических препаратов является *S. boulardii* (Энтерол®). В препарате содержатся лиофилизированные клетки селекционного штамма *S. boulardii*, чрезвычайно устойчивые к физико-химическим воздействиям. При одновременном приеме с антибиотиками жизнеспособные *S. boulardii* выделяются с калом. Энтерол® обладает прямым антимикробным действием в отношении широкого спектра возбудителей, что позволяет использовать препарат не только для элиминации потенциальных возбудителей антибиотикоассоциированной диареи, но и для лечения острых диарей, в том числе ассоциированных с *C. difficile* [3].

Разными исследователями было показано, что применение *S. boulardii* оказывает регулирующее воздействие на иммунные процессы, снижая выработку провоспалительных цитокинов [28].

S. boulardii блокируют активацию белков сигнальной трансдукции семейства митогенактивируемых протеинкиназ, а также NF-κB, стимулирующих транскрипцию провоспалительных генов, в частности кодирующих интерлейкин-8 [14]. Кроме того, *S. boulardii* увеличивает продукцию секреторного иммуноглобулина А в кишечнике, тем самым стимулируя местную иммунную систему органа [7].

Энтерол® оказывает цитопротективные и трофические эффекты по отношению к энтероцитам слизистой оболочки кишечника. Важно отметить, что *S. boulardii* увеличивают продукцию короткоцепочечных жирных кислот, тормозящих развитие условно-патогенных штаммов в кишечнике, вследствие чего угнетаются гнилостные процессы в кишечнике, подавляется синтез аммиака, ароматических аминов, эндогенных канцерогенов [25].

Несмотря на отсутствие строгих рекомендаций по применению пробиотиков, согласно существующим рекомендациям ЕССО, есть достаточное большое количество исследований, показывающих целесообразность их назначения в разных ситуациях при ВЗК [23, 29].

Литература

1. Ливзан МА, Костенко МБ. Место пробиотической терапии в лечении и профилактике антибиотик-ассоциированной диареи. *Лечащий врач*. 2010; 10: 83–4.
2. Осипенко М.Ф., Бикбулатова Е.А., Холин С.И. Пробиотики в лечении диарейного синдрома. *Фарматека*. 2008; 13: 36–41.
3. Осипенко М.Ф., Бикбулатова Е.А. Антибиотико-ассоциированная диарея, подходы к диагностике и лечению. *Фарматека*. 2007; 13: 89.
4. Anantbakrishnan AN, McGinley EL, Binion DG. Excess hospitalisation burden associated with *Clostridium difficile* in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2008; 57: 205–10.
5. Boubnik Y, Raskine L, Simoneau G et al. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *Am J Clin Nutrition* 2004; 80 (6): 1658–64.
6. Bousvaros A, Guandalini S, Baldassano RN et al. A randomized, double-blind trial of lactobacillus GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Diseases* 2005; 11 (9): 833–9.
7. Buts JP. Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 15–8.
8. Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW et al. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100 (7): 1539–46.
9. Castagliuolo I, LaMont JT, Nikulasson ST, Potboulakis C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect Immun* 1996; 64: 5225–32.
10. Chassaing B, Darfeuille-michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol* 2011; 140 (6): 1720–8.
11. Comito D, Romano C. Dysbiosis in the pathogenesis of pediatric inflammatory bowel diseases. *Int J Inflamm* 2012; 2012: 687143.
12. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer R. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease: an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984; 29 (12): 1073–9.
13. Cui HH, Chen CL, Wang JD et al. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10 (10): 1521–5.
14. Chen X, Kokkotou EG, Mustafa N et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both *in vitro* and *in vivo* and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *J Biol Chem* 2006; 281: 24449–54.
15. De Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology* 2008; 111: 1–66.
16. Farrell RJ, LaMont JT. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002.
17. Feillet H, Bach JF. Increased incidence of inflammatory bowel disease: the price of the decline of infectious burden? *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20560–564.
18. Joossens M, Huys G, Cnockaert M et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 2011; 60 (5): 631–7.
19. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53 (11): 1617–23.
20. Looijer-van Langen MAC, Dieleman LA. Probiotics in chronic intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15 (3): 454–62.
21. Mallon P, McKay D, Kirk S, Gardiner K. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Systematic Reviews* 2007; 4: CD005573.
22. McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 812–22.
23. Mowat C, Cole A, Windsor A et al. IBD Section of the British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2011; 60 (5): 571–607.
24. Nagalingam NA, Lynch SV. Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18 (5): 968–80.
25. Oirard-Pipau F, Pompei A, Schneider S et al. Intestinal microflora, short chain and cellular fatty acids, influence of a probiotic *S. boulardii*. *Microb Ecology Health Dis* 2002; 14: 220–7.
26. Oliva-Hemker M, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8112–28.
27. Panes J, Boubnik Y, Reimisch W, Stoker J et al. Imaging techniques for assessment of inflammatory bowel disease: joint ECCO and ESGAR evidence-based consensus guidelines. *J Crohns Colitis* 2013; 7 (7): 556–85; doi: 10.1016/j.crohns.2013.02.020. Epub 2013.
28. Potboulakis C. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30 (8): 826–33.
29. Rabimi R, Nikfar S, Rabimi F et al. A meta-analysis on the efficacy of probiotics for maintenance of remission and prevention of clinical and endoscopic relapse in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2008; 53 (9): 2524–31.
30. Rakoff-Naboum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118 (2): 229–41.
31. Rodemann JF, Dubberke ER, Reske KA et al. Incidence of *Clostridium difficile* infection in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 339–44.
32. Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN et al. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clin Infect Dis* 2000; 31 (4): 1012–7.
33. Tyakbt AV, Kostryukova ES, Maev IV et al. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nature Communications* 2013; 4: 2469; doi: 10.1038/ncomms3469.
34. Veerappan GR, Betteridge J, Young PE. Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Reports* 2012; 14 (4): 324–33.
35. Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterol* 2010; 139 (6): 1844e1–54e1.

*