



РЕГИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ КИШЕЧНИКА КАК ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ФАКТОРЫ ЛОКАЛИЗАЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Жеребятъев А. С., Камышный А. М.

Запорожский государственный медицинский университет

REGIONAL PECULIARITIES OF THE DISTRIBUTION OF INNATE AND ADAPTIVE IMMUNE CELLS IN DIFFERENT SEGMENTS OF THE INTESTINE AS FACTOR DETERMINING THE LOCALIZATION OF THE PATHOLOGICAL PROCESS

Zherebiatiev A. S., Kamyshnyi A. M.

Zaporozhye State Medical University

**Жеребятъев
Александр Сергеевич,
Zherebiatiev Aleksandr S.
E-mail:
Gerya2009@yandex.ru**

Жеребятъев Александр Сергеевич, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Запорожского государственного медицинского университета. Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина (69035, г. Запорожье, проспект Маяковского, 26)

Камышный Александр Михайлович, д. мед. наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Запорожского государственного медицинского университета. Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина (69035, г. Запорожье, проспект Маяковского, 26)

Zherebiatiev Aleksandr Sergeevich, assistant at the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine.

Kamyshnyi Aleksandr Mikhailovich, Doctor of Medicine, Associate Professor at the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine.

Резюме

Кишечник является самым крупным компартментом иммунной системы. Кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань (КАЛТ) является сенсорным датчиком кишечного содержимого и играет важную роль в созревании, активации и дифференцировке лимфоидных клеток. Мы изучили региональные особенности распределения T-bet+ (Th1), GATA-3+ (Th²), RORγt+ (Th17), Foxp3+ (Treg) иммунопозитивных лимфоцитов, а также уровень экспрессии TLR2-, TLR4-, NOD- и RIG-подобных рецепторов врожденного иммунитета лимфоцитами кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани кишечника крыс линии Вистар. Иммунопозитивные лимфоциты определяли с помощью непрямой иммунофлюоресценции с использованием крысиных моноклональных антител. Мы обнаружили, региональные различия распределения популяции иммунных клеток по всей длине кишечника.

Ключевые слова: кишечник, иммунные клетки, кишечечно-ассоциированная лимфоидная ткань.

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2015; 114 (2):46–51

Summary

The intestine represents the largest compartment of the immune system. Gut-associated lymphoid tissue (GALT) is a sensor region for luminal content and plays an important role in lymphoid maturation, activation and differentiation. We studied the regional peculiarities of the distribution of T-bet⁺ (Th1), GATA-3⁺ (Th2), RORγt⁺ (Th17), Foxp3⁺ (Treg) immunopositive lymphocytes and TLR2-, TLR4-, NOD- and RIG-like expression levels by lymphocytes of the gut-associated lymphoid tissue in the intestine of Wistar rats. The immunopositive lymphocytes were determined using an indirect immunofluorescence technique with using a monoclonal rat antibody. We have found regional differences distribution of immune cell populations along the length of the intestine.

Keywords: intestine, immune cells, gut-associated lymphoid tissue.

Экспериментальная и Клиническая Гастроэнтерология 2014; 114 (2):46–51

Введение

Эпидемиологические исследования различных стран мира свидетельствуют о росте заболеваемости воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), точная причина которых остается неизвестной [1]. Кишечный барьер состоит из бактериальной биопленки, слизи, клеток эпителия и кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ). Дисфункция этого комплекса создает предпосылки развития воспалительного процесса в кишечнике. В этом играют ведущую роль образ-распознающие рецепторы (PRR), которые распознают патоген-ассоциированные молекулярные образы микроорганизмов (PAMP). К ним относятся мембранные и эндосомальные Toll-like рецепторы, цитоплазматические NOD-like рецепторы и сенсоры вирусных РНК — RIG-like рецепторы [2].

Функция иммунной системы кишечника заключается в поддержании физиологических функций в условиях постоянной атаки чужеродными компонентами окружающей среды. Есть, однако, существенные различия в содержимом микробных и пищевых антигенов, а также метаболитов в просвете кишечника, в его функциях и строении. Как результат, точный баланс между отдельными типами клеток и механизмом взаимоотношений значительно варьирует по всей длине кишечника. Неудивительно, что в центре внимания иммунных реакций в тонком кишечнике — сохранение барьерной функции эпителия, который участвует в переваривании и всасывании питательных веществ, формировании толерантности к пищевым антигенам. В толстом кишечнике блокируются избыточные иммунные реакции на PAMP комменсальной микрофлоры, количественный уровень которой здесь на несколько порядков выше, чем в тонком кишечнике и достигает 10^{12} в 1 мл содержимого в ободочной кишке.

Изменения уровня экспрессии PRR влияют в свою очередь на характер активации адаптивной иммунной системы и процессы

дифференцировки субпопуляций Т-хелперов в разных отделах кишечника. Среди молекул, экспрессируемых CD4⁺ Т-клетками и претендующих на роль их маркеров наиболее надежными являются транскрипционные факторы. Так, T-bet является фактором транскрипции, который регулирует дифференцировку Т-клеток в направлении Th1, которые опосредуют защиту организма от внутриклеточных бактерий и вирусов и участвуют в развитии аутоиммунных патологий; GATA-3 — фактор транскрипции, направляющий дифференцировку Т-лимфоцитов в направлении Th2, реакции, опосредуемые которыми, защищают организм от внеклеточных патогенов и иницируют гуморальный и аллергический иммунные ответы [3]. Т-регуляторные (Treg) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-лимфоциты участвуют в поддержании периферической толерантности и в контроле иммунного ответа путем иницирования супрессивных эффектов на активированные иммунные клетки. Фактор транскрипции Foxp3 (Forkhead box protein P3) руководит фенотипическим преобразованием наивных Т-клеток в Treg и является более специфическим маркером, чем большинство других маркеров клеточной поверхности. В противоположность этому, Th17 являются субпопуляцией Т-хелперов, которые имеют отношение к развитию провоспалительных и аутоиммунных заболеваний, таких как ВЗК, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, системная красная волчанка, бронхиальная астма [4]. Основным регулятором дифференцировки Th17 является транскрипционный фактор RORγt.

Цель исследования: изучение региональных особенностей распределения T-bet⁺ (Th1), GATA-3⁺ (Th2), RORγt⁺ (Th17), Foxp3⁺ клеток (Treg) а также уровня экспрессии TLR2-, TLR4-, NOD- и RIG-подобных рецепторов врожденного иммунитета лимфоцитами кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани кишечника у крыс линии Вистар.

Материал и методы исследования

Исследования проведены на 20 самцах-крысах линии Вистар весом 110–160 грамм. Экспериментальную часть работы выполняли в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 18.III.1986). Животных выводили из эксперимента декапитированием под наркозом. Изымали участки подвздошной и толстой кишки, и на 20 часов погружали в фиксатор Буэна.

Структуру популяций T-bet⁺, — GATA-3, — Foxp3, — RORγt, — TLR2, — TLR4, — NOD2 и RIGI — иммунопозитивных лимфоцитов (T-bet⁺, GATA-3⁺, Foxp3⁺, RORγt⁺, TLR2⁺, TLR4⁺, NOD2⁺, RIGI⁺) изучали на основании анализа серийных гистологических срезов и данных их морфометрических и денситометрических характеристик. Для проведения данного исследования на ротационном микротоме MICROM HR-360 (Microm, Германия) делали 5-микронные серийные срезы кишечника, которые затем депарафинировали в ксилоле, проводили регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100 %, 96 %, 70 %), отмывали в 0,1 М фосфатном буфере (pH=7,4) и окрашивали гематоксилином-эозином или инкубировали с первичными моноклональными антителами к T-bet, GATA-3, Foxp3, ROR, NOD2 или RIGI (NycultBiotech, Нидерланды). После этого срезы инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) в течение 18 часов во влажной камере при T = 4 °C. Либо инкубировали срезы с антителами к TLR-2 и TLR-4 (NycultBiotech, Нидерланды) конъюгированными с FITC в течение 18 часов во влажной камере при T = 4 °C. После инкубации все срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером и помещали в смеси глицерина и фосфатного буфера (1:9) для последующей люминесцентной

микроскопии. Обработанные гистологические срезы изучали с помощью компьютерной программы ImageJ (NIH, США). Изображение, получаемое на микроскопе Primo Star (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) с помощью высокочувствительной камеры Axio Cam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивирования и подготовки изображений к публикации Axio Vision 4.7.2 (ZEISS, Германия) немедленно вводили в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись области со статистически значимой флуоресценцией, характерной для лимфоидных клеток экспрессирующих рецепторы. Исчислялись морфометрические и денситометрические характеристики иммунопозитивных клеток. При окраске антителами исследовали иммунопозитивные лимфоциты, расположенные в собственной пластинке слизистой оболочки (LAM PR) и в подслизистой основе (TELA SUBM) толстого кишечника, а также расположенные в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок (VILLUS) и в изолированных лимфоидных узелках (ILF) подвздошной кишки крыс. Все полученные экспериментальные данные обрабатывали на персональном компьютере пакетом прикладных и статистических программ EXCEL из пакета MS Office 2010 (Microsoft Corp., США), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001). Для всех показателей рассчитывали значение средней арифметической выборки (M), ее дисперсии и ошибки средней (m). Для выявления достоверности различий результатов исследований в опытных и контрольных группах животных определяли коэффициент Стьюдента (t), после чего определяли возможность разницы выборок (p) и доверительный интервал средней. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Нами были обнаружены региональные различия в распределении популяций иммунных клеток по всей длине кишечника экспериментальных животных. Наименьшая плотность TLR2⁺-лимфоцитов обнаружена в изолированных лимфоидных узелках подвздошной кишки крыс и составляла 24±1 (на 1 мм²), что в 2,8 раз (p<0,05) меньше чем в подслизистой основе проксимального отдела толстого кишечника, где наблюдалась наибольшая плотность TLR2⁺-лимфоцитов равная 68±2 (на 1 мм²). Плотность TLR4⁺-лимфоцитов увеличивалась от 40±1 (на 1мм²) в собственной пластинке слизистой оболочки проксимального отдела толстого кишечника до 82±2 (на 1 мм²) в изолированных лимфоидных узелках подвздошной кишки. Плотность NOD2⁺-лимфоцитов увеличилась в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок подвздошной кишки в 2 раза (p<0,05) по сравнению с их количеством в подслизистой основе дистального отдела толстого кишечника (с 41±2 до 82±2 (на 1мм²)). Плотность RIGI⁺-лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки

ворсинок подвздошной кишки крыс составила 38±1 (на 1мм²), что в 2,6 раз (p<0,05) меньше чем в подслизистой основе дистального отдела толстого кишечника.

Что касается распределения различных субпопуляций T-хелперов, мы наблюдали постепенное увеличение числа T-bet⁺, GATA-3⁺, RORγt⁺, Foxp3⁺-лимфоцитов, от подвздошной кишки к дистальным отделам толстого кишечника. При этом плотность T-bet⁺-лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок подвздошной кишки крыс составляла 49±2 (на 1мм²), что в 2,2 раза (p<0,05) меньше чем в подслизистой основе дистального отдела толстого кишечника, где плотность равна 110±3 (на 1мм²). Плотность GATA-3⁺-лимфоцитов увеличивалась от 39±1 (на 1мм²) в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок подвздошной кишки крыс до 77±3 (на 1 мм²) в подслизистой основе дистального отдела толстого кишечника. Плотность RORγt⁺-лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки проксимального отдела

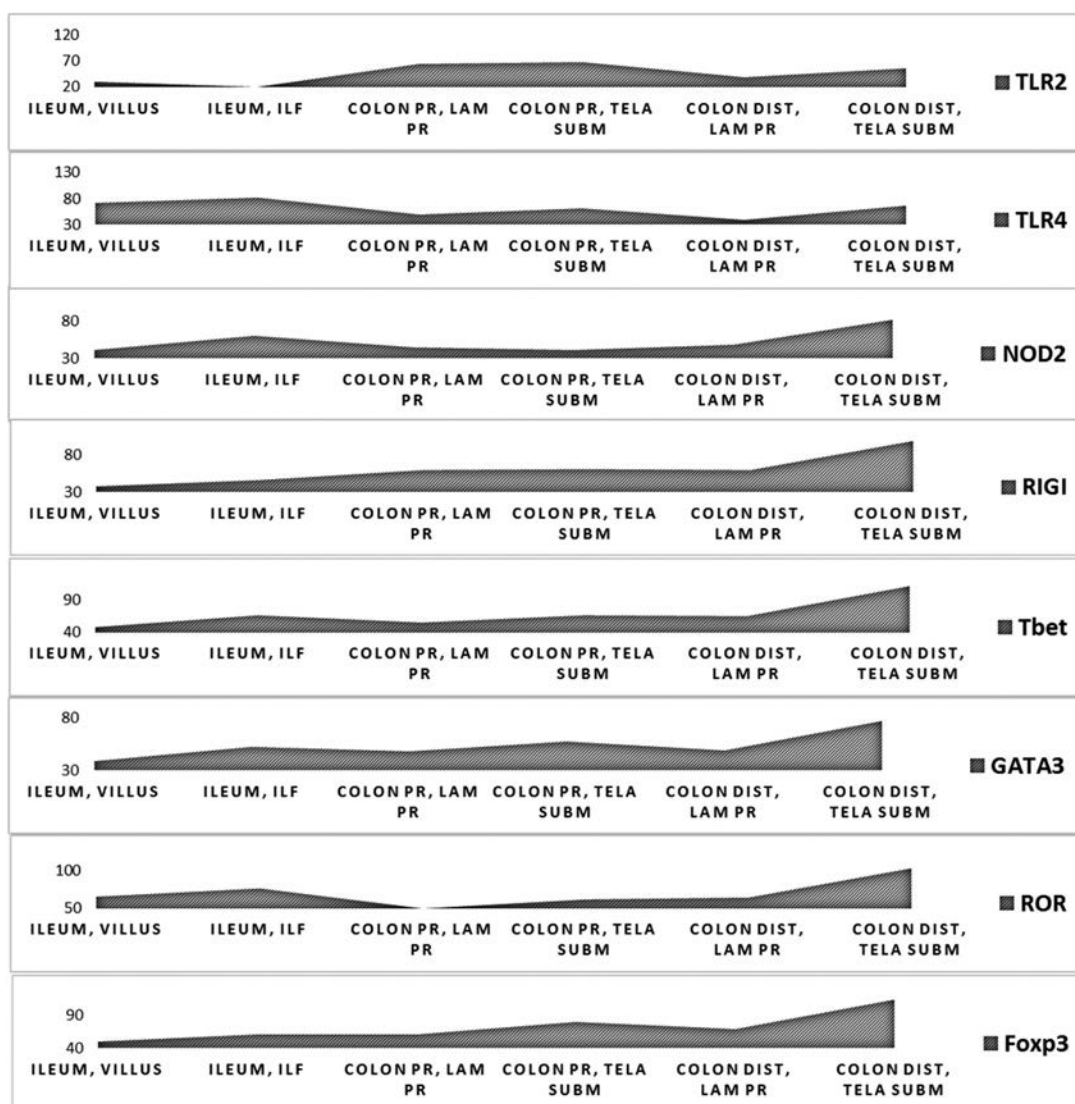


Рисунок 1. Суммарная плотность (количество на 1мм²) TLR2⁺, TLR4⁺, NOD2⁺, RIGI⁺, Tbet⁺, GATA-3⁺, RORγt⁺, Foxp3⁺ — клеток в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок подвздошной кишки (ILEUM, VILLUS); изолированных лимфоидных узелках подвздошной кишки (ILEUM, ILF); собственной пластинке слизистой оболочки проксимального отдела толстого кишечника (COLON PR, LAM PR); подслизистой основе проксимального отдела толстого кишечника (COLON PR, TELA SUBM); собственной пластинке слизистой оболочки дистального отдела толстого кишечника (COLON DIST, LAM PR); подслизистой основе дистального отдела толстого кишечника (COLON DIST, TELA SUBM) контрольной группы экспериментальных животных.

толстого кишечника крыс была минимальной (52 ± 1 (на 1 мм²)) по сравнению с подслизистой основой дистального отдела толстого кишечника, где плотность была максимальной (103 ± 3 (на 1 мм²)). Плотность Foxp3⁺-лимфоцитов увеличилась в подслизистой основе дистального отдела толстого кишечника в 2,3 раза ($p < 0.05$) по сравнению с их количеством в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок подвздошной кишки крыс (от 50 ± 1 (на 1 мм²) до 115 ± 3 (на 1 мм²)) (рис.1).

На сегодняшний день лишь немногие исследования описывают региональные изменения экспрессии PRR в различных отделах кишечника, и они касаются в основном эпителия, а не лимфоидных клеток. Наши результаты совпадают с данными полученными Ortega-Cava et al. который показал, что TLR2 экспрессируется на более высоком уровне эпителиоцитами в проксимальном отделе толстого кишечника, чем в дистальном. С другой стороны, он показал, что TLR4 интенсивнее экспрессируется эпителием толстого кишечника, чем тонкого, но наши результаты

описывают противоположную ситуацию [5]. Хотя функциональные последствия этих различий остаются неясными, они, кажется, обусловлены микробиотой. Наконец, NOD2 в основном экспрессируется в подвздошной кишке. Это согласуется с ассоциацией мутаций NOD2 с болезнью Крона [6]. Между тем, прямая экспрессия PRR лимфоцитами влияет на их активацию, пролиферацию, выживание и продукцию цитокинов [7]. Стимуляция агонистами TLR2 способствует дифференцировке Th17 *in vitro* и приводит к пролиферации и продукции Th17-зависимых цитокинов, а сигнализация через TLR-4 влияет на функциональную активность Treg — введение LPS приводит к усилению их пролиферации и выживания *in vitro* и *in vivo*, а супрессивная активность Treg увеличивается в 10 раз [8].

Как сообщалось T.L. Denning et al. существует обратная корреляция между числом Th17 и Treg клетками по всей длине кишечника у мышей, число Th17 постепенно уменьшается от двенадцатиперстной кишки к толстому кишечнику, а число

Treg самое высокое в толстом кишечнике [9]. Наши данные совпадают с вышеизложенными и также показывают нарастание количества Т-хелперов от подвздошной кишки к дистальному отделу толстого кишечника.

Кроме того, в тонком кишечнике CD4⁺ Т-клетки представлены примерно равным соотношением Foxp3⁺ и Foxp3⁻ CD4⁺ Т-клеток, в то время как большинство IL-10-продуцирующих клеток в толстой кишке являются Foxp3⁺ Treg клетками [10]. У людей более высокий процент IL-17-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток был зарегистрирован в собственной пластинке толстой кишки и подвздошной кишки по сравнению с тощей [11]. Другие исследования, проведенные M. J. Wolff et al. показывают, что слепая кишка имеет более высокие уровни Th17, Th22 и Foxp3⁺ Treg клеток по сравнению с терминальным отделом подвздошной кишки и более дистальными отделами толстой кишки. В отличие от этого, частота Th1 и Th2 клеток, кажется, не существенно различается по всей длине кишечника человека [12].

Большинство заболеваний кишечника анатомически ограничены. Хотя это более очевидно в случае с патогенными инфекциями, у которых есть своя собственная специальная ниша, это также относится к воспалительным и злокачественным заболеваниям. Тем не менее, остается неясным, как вышеупомянутые различия в соотношении эффекторных Т-клеток, Treg клеток и других субпопуляций в тонкой и толстой кишке влияют на локализацию болезни. Многие из генетических факторов, лежащих в основе восприимчивости к болезни Крона, детерминированы врожденными и адаптивными иммунными ответами против бактерий. К ним относятся NOD2, ATG16L1 и IRGM1. Производство антимикробных пептидов клетками Панета уменьшается у пациентов с болезнью Крона. Наиболее частый ген восприимчивости — нефункциональная мутация в NOD2, который определяется у 25–30% больных с терминальным илеитом [6]. Экспериментальные модели спонтанных ВЗК у дефицитных по этим генам мышей, или мышей у которых заболевание вызвано передачей Т-клеток или введением химических агентов, таких как декстран сульфат натрия (DSS), как правило, часто ограничены дистальным отделом толстой кишки и слепой кишкой [5]. Почти все из этих моделей являются зависимыми от наличия микробиоты и связаны с CD4⁺ Т-клетками, продуцирующими IL-17 и другие провоспалительные цитокины. Одним исключением из этого является экспериментальный колит, который индуцирован

у грызунов путем ректальной инстилляции оксазолон, который, как полагают, обусловлен изменением продукции супрессорного IL-13 врожденными лимфоцитами, в том числе iNKT-клетками [13]. Похожие IL-13-продуцирующие iNKT клетки были зарегистрированы у людей с неспецифическим язвенным колитом, но их прямая роль при этой патологии была поставлена под сомнение. Интересно, что мыши с CD11c⁺ клеточно-ограниченным дефицитом фактора TRAF6 имели редуцированное количество Foxp3⁺Treg-клеток и у них развивалась микробиота-зависимое, Th2-опосредованное воспаление в тонком кишечнике, но не в толстой кишке. И наоборот, CD11c⁺-ограниченный дефицит TGFβ-активации интегрин αVβ8 приводит к снижению числа Treg и к воспалению толстого кишечника, но не влияет на тонкий кишечник [14].

В тонкой кишке преобладают процессы, которые связаны с защитой от внеклеточных микроорганизмов, в том числе выработка IL-17, IL-22 и антимикробных пептидов. С другой стороны, толстый кишечник выступает в качестве основного резервуара для комменсальной микрофлоры, и его иммунная система, кажется, направлена на предотвращение воспалительные реакции против них. Обнаруженные нами региональные особенности распределения клеток врожденного и адаптивного иммунитета в различных отделах кишечника могут быть определяющими факторами локализации патологического процесса, и дальнейшее изучение этих особенностей имеет большое значение. Становится все более очевидным, что разнообразие в концентрации пищевых и бактериальных метаболитов, а также широкое разнообразие индивидуальных видов бактерий, которые населяют различные участки в кишечнике, играют ключевую роль в региональной иммунной специализации. Эти результаты подчеркивают потенциал для новых стратегий лечения воспалительных заболеваний кишечника. Между тем, еще целый ряд вопросов остается нерешенным: каков относительный вклад факторов окружающей среды и внутренних метаболитов организма в распределении иммунных клеток на протяжении кишечника?; как региональные различия в микробном составе и пищевых антигенах влияют на состав лимфоцитов и каковы молекулярные механизмы таких влияний?; как разное представительство клеток врожденного и адаптивного иммунитета влияет на физиологические функции кишечника и локализацию патологического процесса?

Выводы

1. Наибольшая плотность TLR2⁺-лимфоцитов обнаружена в проксимальном отделе толстого кишечника, TLR4⁺-лимфоцитов в подвздошной кишке, NOD2⁺-лимфоцитов в подвздошной кишке и проксимальном отделе толстого кишечника, RIGI⁺-лимфоцитов в проксимальном отделе толстого кишечника.
2. Распределение различных субпопуляций Т-хелперов было следующим — постепенное увеличение числа T-bet⁺, GATA-3⁺, RORγt⁺, Foxp3⁺-лимфоцитов, от подвздошной кишки к дистальным отделам толстого кишечника.

Литература

1. Sartor R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006, vol. 3, no. 7, pp. 390–407.
2. Wells J. M., Rossi O., Meijerink M. et al. Epithelial cross-talk at the microbiota-mucosal interface. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2011, vol. 1, pp. 4607–4614.
3. Bluestone J., Mackay C., O'Shea J. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, vol. 9, pp. 811–816.
4. Weaver C. T., Hatton R. D., Mangan P. R. et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, vol. 25, pp. 821–852.
5. Ortega-Cava C.F., Ishihara S., Rumi M. A. et al. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J. Immunol.*, 2003, vol. 170, pp. 3977–3985.
6. Barrett J. C., Hansoul S., Nicolae D. L. et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genet.*, 2008, vol. 40, pp. 955–962.
7. Fukata M., Breglio K., Chen A. et al. The myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for CD4+ T cell effector function in a murine model of inflammatory bowel disease. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no.3, pp. 1886–1894.
8. Medvedev A. E., Sabroe I., Hasday J. D. et al. Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. *J. Endotoxin Res.*, 2006, vol. 12, no.3, pp. 133–150.
9. Denning T. L., Norris B. A., Medina-Contreras O. et al. Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, pp. 733–747.
10. Veenbergen S. Samsom, J.N. Maintenance of small intestinal and colonic tolerance by IL10 producing regulatory T cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.*, 2012, vol. 24, pp. 269–276.
11. Sathaliyawala T., Kubota M., Yudanin N. et al. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity.*, 2013, vol. 38, pp. 187–197.
12. Wolff M. J., Leung J. M., Davenport M. et al. TH17, TH22 and TReg cells are enriched in the healthy human cecum. *PLoS*, 2012, vol. 3, no. 7, pp. 187–197.
13. Fuss I. J., Heller F., Boirivant M. et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* 2004, vol. 113, pp.1490–1497.
14. Paidassi H., Acharya M., Zhang A. et al. Preferential expression of integrin $\alpha\beta 8$ promotes generation of regulatory T cells by mouse CD103+ dendritic cells. *Gastroenterology*, 2011, vol. 141, pp. 1813–1820.