

## ПОВРЕЖДЕНИЕ ПАРЕНХИМЫ И НАРУШЕНИЕ ПЕРФУЗИИ ПЕЧЕНИ В ПРОГРЕССИРОВАНИИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

Дуданова О. П., Белавина И. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Петрозаводский государственный университет»  
Министерства образования и науки Российской Федерации

## HEPATIC PARENCHIMATOUS DAMAGE AND PERFUSION DISTURBANCE IN THE PROGRESSION OF NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

O. P. Dudanova, I. A. Belavina

Federal state budgetary educational institution of higher professional education «Petrozavodsk state university» of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation

**О. П. Дуданова** — Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Петрозаводский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, заведующая кафедрой пропедевтики внутренних болезней, доктор медицинских наук, профессор.

**И. А. Белавина** — Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования «Петрозаводский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней, кандидат медицинских наук.

**O. P. Dudanova** — Federal state budgetary educational institution of higher professional education «Petrozavodsk state university» of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, head of the Department of Internal Medicine Propaedeutics, doctor of Medical sciences. Professor.

**I. A. Belavina** — Federal state budgetary educational institution of higher professional education «Petrozavodsk state university» of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, assistant of the Department of Internal Medicine Propaedeutics, Candidate of Medical sciences.

Дуданова  
Ольга Петровна  
Dudanova Olga P.  
E-mail:  
odudanova@gmail.com

### Резюме

**Цель:** определение ранних диагностических критериев печеночно-клеточного воспаления и формирующейся портальной гипертензии для выявления прогрессирующего течения НАЖБП.

**Материалы и методы.** Обследовано 58 больных неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП): 6 стеатозом, 47 стеатогепатитом (СГ), 5 циррозом печени (ЦП) класса А. Биопсия выполнена 24 (41,4%) больным с оценкой индекса гистологической активности (ИГА) и фиброза по методу Brunt. Всем пациентам выполнено ультразвуковое исследование с оценкой структуры печени и доплерография с определением кровотока по воротной и селезеночной венам и индекса застоя в воротной вене.

**Результаты.** Среди традиционных лабораторных маркеров паренхиматозного повреждения печени с наибольшей частотой выявлялось увеличение уровня гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП) — у 77,6% пациентов, АЛАТ и АСАТ повышались реже — у 62,0% и 51,7% больных соответственно. ГГТП теснее коррелировала с ИГА: с жировой дистрофией гепатоцитов  $r=0,82$  ( $p<0,01$ ), с баллонной дистрофией —  $r=0,65$  ( $p<0,05$ ), с лобулярным воспалением —  $0,58$  ( $p<0,05$ ), с фиброзом  $r=0,67$  ( $p<0,05$ ), чем АЛАТ —  $0,51$  ( $p<0,05$ ),  $0,48$  ( $p<0,05$ ),  $0,42$  ( $p<0,05$ ),  $0,51$  ( $p<0,05$ ) соответственно. Ухудшение венозной перфузии печени при доплерографическом исследовании наблюдалось уже при умеренной активности СГ, когда еще отсутствовали клинические симптомы портальной гипертензии. Индекс застоя в воротной вене тесно коррелировал с ИГА  $r=0,78$  ( $p<0,05$ ) и фиброзом  $r=0,69$  ( $p<0,05$ ), что подтверждало его диагностическую роль в выявлении нарушения паренхиматозной и сосудистой архитектоники печени и развития портальной гипертензии.

**Заключение.** ГГТП является более чувствительным маркером паренхиматозного повреждения при НАЖБП, чем аминотрансферазы. Исследование венозной перфузии печени с определением индекса застоя в воротной вене позволяет выявлять портальную гипертензию задолго до появления клинических симптомов данного синдрома. Повреждение паренхимы печени и нарушение ее перфузии свидетельствуют о прогрессирующем течении НАЖБП.

**Ключевые слова.** Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), гистологическая активность, гаммаглутамилтранспептидаза, венозная перфузия печени, индекс застоя воротной вены, прогрессивное течение НАЖБП.

## Summary

**Aim:** to detect early diagnostic criterions of hepatocellular inflammation and portal hypertension for revealing the progressive course of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

**Materials and methods.** We have studied 58 patients with NAFLD: 6 with steatosis, 47 with steatohepatitis (SH), 5 with class A liver cirrhosis (LC). Liver biopsy was performed in 24 (41,4%) patients with estimation of histological activity index (HAI) and fibrosis by Brunt method. Abdominal sonography and dopplerography of portal and spleen venous bloodflow with estimation of portal vein congestive index (CI) were performed in all patients.

**Results.** Among conventional laboratory markers of parenchymatous damage gammaglutamiltransferase (GGTF) was increased more frequently — in 77.6% of patients, then alaninaminotransferase (ALAT) — in 62.0% and aspartataminotransferase (ASAT) — in 51.7% of patients. GGTF correlated more closely with HAI: with fatty cellular degeneration  $r=0.82$  ( $p<0.01$ ), bottled cellular degeneration —  $r=0.65$  ( $p<0.05$ ), lobular inflammation —  $0.58$  ( $p<0.05$ ), fibrosis  $r=0.67$  ( $p<0.05$ ), than ALAT —  $0.51$  ( $p<0.05$ ),  $0.48$  ( $p<0.05$ ),  $0.42$  ( $p<0.05$ ),  $0.51$  ( $p<0.05$ ) accordingly. Liver venous perfusion worsening was revealed already in moderate SH, when clinical symptoms of portal hypertension were absent. CI in portal vein correlated closely with HAI  $r=0.78$  ( $p<0.05$ ) and fibrosis  $r=0.69$  ( $p<0.05$ ) in NAFLD, that confirmed its diagnostic role in detection of parenchymatous and vascular liver architectonics deterioration and portal hypertension development.

**Conclusion.** GGTF is more sensitive parenchymatous damage marker in NAFLD than ALAT and ASAT. Liver venous perfusion study with estimation portal vein congestive index permits to reveal the portal hypertension long before clinical symptoms of this syndrome appearance. Liver parenchymatous damage and its perfusion disturbance confirm the NAFLD progressive course.

**Keywords:** Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), histological activity, gammaglutamiltransferase, liver venous perfusion, portal vein congestive index, NAFLD progressive course.

Экспериментальная и Клиническая Гастроэнтерология 2014; 108 (8):41–45

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) в последние три десятилетия становится одной из самых распространенных заболеваний печени, поражая 15–40% населения различных стран, в связи с повсеместным ростом ожирения и диабета среди лиц разного возраста [1, 2, 8, 9]. Данное заболевание отличается медленной прогрессией, проходя стадии стеатоза, стеатогепатита с развитием цирроза печени, печеночной недостаточности и даже гепатоцеллюлярной карциномы [7, 9]. Часто пациенты не доживают до конечных этапов естественного развития НАЖБП, умирая от сосудистых катастроф таких сопутствующих заболеваний, как ишемическая болезнь сердца и гипертоническая болезнь.

## Материал и методы исследования

Обследовано 58 больных НАЖБП: 6 стеатозом, 47 стеатогепатитом и 5 циррозом печени. Диагноз устанавливался на основании клинических данных: наличия абдоминального ожирения, окружности талии у женщин  $> 80$  см, у мужчин  $> 94$  см, увеличенного индекса массы тела, наличия сахарного диабета 2 типа, дислипидемии; оценке традиционных лабораторных показателей, отражающих структурное и функциональное состояние печени: аланинаминотрансферазы (АЛАТ), аспартатамино-трансферазы (АСАТ), билирубина, щелочной фосфатазы (ЩФ), гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП), альбумина, протромбина, гамма-глобулинов. Для исключения вирусной этиологии хронического гепатита всем пациентам исследовались

Кроме того клиническая симптоматика НАЖБП отличается скудостью проявлений вплоть до появления портальной гипертензии, в связи с чем долгое время заболевание остается нераспознанным. В связи с этим актуальной является проблема раннего доклинического выявления симптомов повреждения паренхимы печени и ухудшения перфузии для распознавания активности процесса и синдрома портальной гипертензии.

**Целью** исследования явилось определение ранних диагностических критериев печеночно-клеточного воспаления и формирующейся портальной гипертензии для прогнозирования прогрессирующего течения НАЖБП.

антитела к вирусу гепатита С, австралийский антиген, антитела к ядерному протеину вируса гепатита В, для исключения аутоиммунного поражения печени определялись антиядерные и антимитохондриальные антитела, для исключения гемохроматоза — ферритин. Алкогольный генез гепатита исключался на основании анамнестических данных о редком и в небольших количествах ( $<20$ – $40$  мл в пересчете на этанол) употреблении алкоголя, отсутствия алкогольных стигматов, признаков поражения других органов, на основании клинико-лабораторных и гистологических данных.

Слепая чрескожная или лапароскопическая биопсия печени выполнена 24 (41,4%) больным

с оценкой степени стеатоза, воспаления и фиброза по методу Brunt [4, 5, 6], который включал следующие компоненты: степень повреждения гепатоцитов в виде крупнокапельной, мелкокапельной и смешанной жировой дистрофии (0–3 балла), баллонной дистрофии гепатоцитов (0–3); степень лобулярного воспаления (0–3) и портального воспаления (0–3). Определялся фиброз в различных зонах ацинуса, в портальных трактах и перипортальной области (0–4).

При ультразвуковом исследовании (УЗИ) на аппарате Aloka SSD2200 оценивались размеры и структура печени, степень затухания ультразвука, размеры селезенки, диаметры воротной и селезеночной вен. При доплерографии сосудов печени на аппарате Vivid Pro-7 (General Electric,

USA) определялись показатели венозной перфузии печени: линейная скорость кровотока (ЛСК) в воротной и селезеночной венах, индекс застоя (ИЗ) в воротной вене по формуле:  $ИЗ = S_{ВВ} / ЛСК_{ВВ}$ , где  $S_{ВВ}$  — площадь поперечного сечения ВВ,  $см^2$ , ЛСК — линейная скорость кровотока в воротной вене,  $см/сек$ . Допплеровские показатели печеночного кровотока у больных НАЖБП сравнивали с таковыми у здоровых лиц ( $n=25$ ), у кого диаметр ВВ составил  $9,7 \pm 0,2$  мм, СВ —  $5,9 \pm 0,9$  мм, ЛСК по ВВ —  $23,8 \pm 4,2$   $см/сек$ , ЛСК по СВ —  $25,1 \pm 2,7$   $см/сек$ , ИЗ ВВ —  $0,032 \pm 0,007$ .

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета программ Statistica 6 с определением t-теста Стьюдента, теста Манна-Уитни, коэффициента корреляции Спирмена.

## Результаты исследования и их обсуждение

Обследовано 58 больных НАЖБП: женщин — 35 (60,3%), мужчин — 23 (39,7%) в возрасте  $47,3 \pm 6,9$  года (18–71) с ИМТ —  $33,0 \pm 3,6$   $кг/м^2$ . Сахарным диабетом (СД) 2 типа страдали 18 (31,0%) пациентов, гипертонической болезнью — 23 (39,7%), подагрой — 4 (6,9%). Среди обследованных лиц признаки стеатоза печени выявлялись у 6 (10,3%), стеатогепатита (СГ) — у 47 (81,0%), цирроза печени (ЦП) класса А — у 5 (8,6%). Стеатоз печени диагностирован на основании увеличения размеров печени при УЗИ и усиления эхогенности печени при нормальных печеночных тестах у больных, страдающих СД 2 типа. Биопсия печени данным пациентам не проводилась. Стеатогепатит установлен на основании обнаружения лабораторных маркеров цитолиза и внутрипеченочного холестаза — увеличения АЛАТ, АСАТ, ГГТП, ЩФ. Диагноз стеатогепатита подтвержден при гистологическом исследовании биоптатов печени у 22 (46,8%) больных. Цирроз печени диагностирован при гистологическом исследовании печени у 2 больных, у остальных 3 — на основании наличия клинических признаков портальной гипертензии с явлениями гиперспленизма и наличием у 2 — варикозного расширения вен нижней трети пищевода. Слабая активность некротически-воспалительного процесса в печени по лабораторным и гистологическим данным диагностирована у 17 (32,7%), умеренная — у 20 (38,5%), высокая — у 15 (28,8%) пациентов.

Лабораторные признаки паренхиматозного повреждения выявлялись у больных стеатогепатитом и циррозом печени и характеризовались увеличением активности АЛАТ от  $48,4 \pm 15,2$  Ед/л при слабой активности СГ до  $121,6 \pm 20,5$  Ед/л ( $p < 0,05$ ) при высокой активности СГ и  $69,7 \pm 13,9$  Ед/л ( $p < 0,05$ ) при ЦП, АСАТ соответственно увеличивалась от  $38,6 \pm 18,4$  Ед/л до  $80,8 \pm 4,1$  Ед/л ( $p < 0,01$ ) и  $63,8 \pm 20,5$  Ед/л ( $p < 0,05$ ) соответственно (табл. № 1).

Отмечался рост маркеров внутрипеченочного холестаза — ЩФ и ГГТП, причем последняя изменялась чаще, чем ЩФ. Концентрация же билирубина в сыворотке крови, как общего, так и прямого, возрастала только при СГ высокой активности до  $25,3 \pm 12,4$   $мкмоль/л$  и при ЦП —  $30,6 \pm 12,1$   $мкмоль/л$ . В отличие от гепатитов другой этиологии

(алкогольной, вирусной и тем более аутоиммунной) мезенхимально-воспалительный синдром при НАЖБП был менее выраженным на стадии гепатита и только при ЦП уровень  $\gamma$ -глобулинов достоверно возрастал до  $13,5 \pm 0,9$  г/л по сравнению со СГ слабой активности —  $10,3 \pm 0,5$  г/л ( $p < 0,05$ ) и умеренной активности —  $10,9 \pm 0,6$  г/л ( $p < 0,05$ ).

Гистологические показатели паренхиматозного повреждения и воспаления были более чувствительными, чем лабораторные тесты. Важно отметить, что традиционные показатели цитолитического синдрома — аминотрансферазы превышали норму реже, чем ГГТП, который относится к маркеру внутрипеченочного холестаза, а в последнее время его рассматривают еще и как показатель инсулинорезистентности [3]. Так, уровень АЛАТ превышал норму у 32 (61,5%) из 52 больных с признаками СГ и ЦП, АСАТ — у 27 (51,9%), билирубина — у 11 (21,1%), а ГГТП — у 41 (78,8%), а признаки паренхиматозного повреждения в виде баллонной и жировой дистрофии выявлялись у 100% обследованных. ГГТП тесно коррелировала с показателями гистологической активности:  $r=0,65$  ( $p < 0,05$ ) с баллонной дистрофией,  $r=0,82$  ( $p < 0,01$ ) с жировой дистрофией,  $r=0,58$  ( $p < 0,05$ ) с лобулярным воспалением,  $r=0,67$  ( $p < 0,05$ ) с фиброзом; в то же время связь АЛАТ с данными показателями была менее выраженной:  $r=0,48$  ( $p < 0,05$ ),  $r=0,51$  ( $p < 0,05$ ),  $r=0,42$  ( $p < 0,05$ ),  $r=0,51$ , как и АСАТ:  $r=0,52$  ( $p < 0,05$ ),  $r=0,53$  ( $p < 0,05$ ),  $r=0,45$  ( $p < 0,05$ ),  $r=0,64$  соответственно.

Лабораторный маркер иммунного воспаления —  $\gamma$ -глобулины превышали нормальный уровень лишь у 18 (34,6%) пациентов, в то время как лобулярное и портальное воспаление выявлялось у 100% больных при гистологическом исследовании. Отмечалась позитивная корреляционная связь уровня  $\gamma$ -глобулинов с лобулярным воспалением  $r=0,43$  ( $p < 0,05$ ) и с портальным воспалением  $r=0,39$  ( $p < 0,05$ ).

Данные факты свидетельствуют о достаточно низкой чувствительности общепринятых маркеров гепатоцеллюлярного повреждения и иммунного воспаления при НАЖБП, особенно на стадии стеатогепатита, и лишь на стадии цирроза печени они возрастают и приобретают диагностическое

Таблица №1

Лабораторные, гистологические и перфузионные показатели при разных формах НАЖБП (M±m)

**Примечание:**

\*- разница достоверна со СГ слабой активности

\*\* - разница достоверна со СГ умеренной активности

\*\*\* - разница достоверна со СГ высокой активности

^ - разница достоверна по сравнению с контрольной группой здоровых лиц

Показатели	СГ слабой активности, n=17	СГ умеренной активности, n=20	СГ высокой активности, n=10	Цирроз печени, n=5
АЛАТ, Ед/л	48,4±15,2*	79,6±12,9**,**	121,6±20,5**,**	69,7±13,9*, ***
АСАТ, Ед/л	38,6±18,4	52,3±19,5*,	80,8±4,1*, ***	63,8±12,5**,***
Билирубин общий, мкмоль/л	15,3±2,3	17,6±4,8	25,3±12,4	30,6±12,1*, **
ЩФ, Ед/л	146,8±7,2	154,3±5,9	165,6±11,1 *	182,7±55,4
ГГТП, Ед/л	36,8±12,4	57,3±12,0*	77,9±23,5*	82,5±16,2*, **
γ-глобулины, г/л	10,3±0,5	10,9±0,6	11,5±0,5*	13,5±0,9*, **
Балонная дистрофия гепатоцитов, баллы	1,2±0,5	1,3±0,4	2,3±0,5*	-
Жировая дистрофия гепатоцитов, баллы	1,15±0,3	1,8±0,4*	2,4±0,5*, **	-
Лобулярное воспаление, баллы	0,6±0,4	1,3±0,5*	2,1±0,7*, **	-
Портальное воспаление, баллы	1,1±0,3	1,3±0,4	2,5±0,5	-
Индекс гистологической активности, баллы	4,1±0,3	5,8±0,3*	9,3±0,4*, **	-
Фиброз, баллы	1,0±0	1,46±0,4	2,9±0,3*, **	-
ЛСК ВВ, см/сек.	20,8±4,6	19,3±2,4^	16,1±2,5^, **	13,5±2,8^, *, **, ***
ЛСК СВ, см/сек.	22,8±3,2	20,7±2,5^,	18,4±3,7^, **, **	14,8±3,0^, *, **, ***
ИЗ ВВ	0,036±0,01^	0,043±0,005^, *	0,044±0,005^, *	0,061±0,007*, **, ***

значение. Биопсия печени остается «золотым стандартом» распознавания активности и стадии НАЖБП.

Фиброз у большинства обследованных лиц с НАЖБП был слабо выражен, коллагеновые волокна локализовались внутри дольки в очагах лобулярного воспаления, перипортально, вдоль синусоидов, в 3 зоне ацинусов и в небольшом количестве в портальных трактах. Только при высокой активности СГ появлялся более выраженный фиброз портальных трактов, формировались единичные неполные порто-центральные и портопортальные септы, а при ЦП выявлялись полные фиброзные септы и ложные дольки.

Параллельно с развитием паренхиматозного повреждения, воспаления и фиброза, ухудшались показатели венозной перфузии печени, свидетельствуя о развитии портальной гипертензии. Начиная уже с умеренной активности СГ, происходило достоверное по сравнению со здоровыми лицами снижение ЛСК по ВВ и СВ, возрастал ИЗ ВВ. ЛСК по ВВ снижалась при умеренной активности СГ до 19,3±2,4 см/сек. (у здоровых она составляла 23,8±4,2 см/сек.), при высокой активности — до 16,1±2,5 см/сек (p<0,05) и при ЦП до 13,5±2,8 см/сек. (p<0,1). Подобная же динамика была со стороны ЛСК по СВ (табл. № 1). Особенно чувствительным являлся комплексный

сосудистый индекс — ИЗ ВВ, который возрастал до 0,043±0,005 (p<0,05) при умеренной активности СГ (в норме он составлял 0,032±0,007), до 0,044±0,005 (p<0,05) при высокой активности и до 0,061±0,007 (p<0,01) при ЦП.

Отмечалась тесная связь перфузионных показателей с лабораторными и гистологическими маркерами паренхиматозного повреждения, воспаления и фиброза. Так, ИЗ ВВ позитивно коррелировал с уровнем АЛАТ- r=0,49 (p<0,05), еще теснее с ГГТП — r = 0,69 (p<0,05), с индексом гистологической активности — r=0,78 (p<0,05) и фиброзом — r=0,69 (p<0,05). Менее тесными были связи ЛСК по ВВ и СВ с данными показателями. ЛСК ВВ негативно коррелировала с АЛАТ r= -0,42 (p<0,05), с ГГТП r= -0,60 (p<0,05), с индексом гистологической активности r= -0,60 (p<0,05) и фиброзом r= -0,56 (p<0,05); ЛСК СВ — r= -0,45 (p<0,05), r= -0,63 (p<0,05), r= -0,69 (p<0,05) и r= -0,57 (p<0,05) соответственно.

Жировая и балонная дистрофия гепатоцитов, лобулярная и портальная инфильтрация, коллагенизация синусоидов, перипортальный фиброз, фиброз портальных трактов, формирующиеся портоцентральные септы способствовали росту внутрипеченочного сосудистого сопротивления и развитию портальной гипертензии при НАЖБП.

**Выводы**

1. Гаммаглутамилтранспептидаза является более чувствительным маркером паренхиматозного повреждения печени при НАЖБП по сравнению с аминотрансферазами.
2. Гистологическое исследование биоптата печени остается «золотым стандартом» в диагностике печеночно-клеточного воспаления при НАЖБП.
3. Оценка венозной перфузии печени с определением индекса застоя в воротной вене позволяет задолго до клинических проявлений портальной гипертензии распознавать формирование данного синдрома уже при умеренной активности стеатогепатита.
4. Наличие признаков паренхиматозного повреждения и нарушения перфузии печени свидетельствуют о прогрессирующем течении НАЖБП.

## Литература

1. Богомолов П. О., Шулпекова Ю. О. Неалкогольная жировая болезнь печени: стеатоз и неалкогольный стеатогепатит // *Клин. перспективы гастроэнтерол. гепатол.*— 2004.— № 3.— С. 20–26.
2. Драккина О. М., Гацולהва Д. С., Ивашкин В. Т. Неалкогольная жировая болезнь печени как компонент метаболического синдрома // *Российские медицинские вести.*— 2010.— № 2.— С. 72–78.
3. Arase Y., Heianza Y., Hara S. *et al.* Potential impact of joint association of alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase on insulin resistance in Japan: the Toranomon Hospital Health Management Center Study 19 (TOPICS 19) // *Hepato Res.*— 2014.— Apr 11. doi: 10.1111/hepr.12343. [Epub ahead of print].
4. Brunt E. M., Janney C. G., Di Bisceglie A. M. *et al.* Non-alcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions // *Am. J. Gastroenterol.*— 1999.— Vol. 94.— P. 2467–2474.
5. Brunt E. M., Tiniakos D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease // *World. J. Gastroenterol.*— 2010.— Vol. 16, № 42.— P. 5286–5296.
6. Brunt E. M. Nonalcoholic fatty liver disease: what the pathologist can tell the clinician // *Dig Dis.*— 2012.— Vol. 30 (1).— P. 61–68.
7. Bugianesi E., Leone N., Vanni E. *et al.* Expanding the natural history of nonalcoholic steatohepatitis: from cryptogenic cirrhosis to hepatocellular carcinoma // *Gastroenterology.*— 2002.— Vol. 123 (1).— P. 134–40.
8. Ludwig J., McGill, D.B., and Lindor, K. D. Nonalcoholic steatohepatitis // *J. Gastroenterol. Hepatol.*— 1997.— Vol. 12.— P. 398–403.
9. McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease // *Clinics in Liver Disease.*— 2004.— Vol. 8 (3).— P. 521–533.