

УДК 574.172.6-31:611-018.83:611.3

П.А. Мотавкин

## ОКСИД АЗОТА В ОРГАНАХ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Владивостокский государственный медицинский университет

*Ключевые слова: оксид азота, пищеварение, регуляция.*

Литературные данные последнего времени свидетельствуют в пользу оксида азота как универсального регулятора пищеварительных органов, оказывающего ауто-, пара- и, очевидно, телокринное действие. Он образуется в клетках пищеварительной системы тремя изоформами нитроксидсинтазы избирательно локализованных в производных экто-, энто- и мезодермы. Под влиянием пищи и продуктов ее гидролиза эпителиоциты слизистой оболочки экспрессируют оксид азота первыми; последовательно в нитроксидергическую регуляцию включается нитроксид местных нейронов и гладких миоцитов. Содружественная функция всех нитропозитивных элементов обеспечивает адекватную секреторную активность, скорость избирательного всасывания и подвижность органов пищеварения.

Энтеральная нервная система человека содержит около ста миллионов нейронов [10]. При относительно небольшом морфологическом разнообразии, ее интрамуральные нейроны нейрхимически неоднородны. Среди них имеются клетки с такими медиаторами, как ацетилхолин, норадреналин, пурины, серотонин, а также совместно с ними или самостоятельно нейроны с регуляторными пептидами. К этим веществам, разнообразным по химической структуре и направленности действия, присоединяется оксид азота.

Совместная локализация нейропептидов и оксида азота у животных и человека установлена в пилорической части желудка. В его ауэрбаховом сплетении имеются нейроны, аккумулирующие оксид азота и вазоинтестинальный пептид, оксид азота и соматостатин, оксид азота и нейропептид Y. Сходные типы нейронов идентифицированы в 12-перстной кишке. Найдена густая сеть иммунореактивных волокон и нейронов в ее подслизистом сплетении у человека, существенно отличающиеся от таковой мелких животных [24, 26, 27]. В последнее время обнаружены нейроны с гемоксигеназой и нитроксидсинтазой в межмышечном и подслизистом сплетениях привратника и тощей кишки [21]. Из них от 10 до 40% совместно секреторируют оксиды углерода и азота.

Подавляющее большинство нейронов I типа Догеля образуют оксид азота. Как известно, эти клетки являются холинергическими, иннервирующими в пищеварительной системе гладкую мышечную ткань и железистый аппарат. Секретция нитроксида происходит при обязательном участии ацетилхолина, который рассматривается как важнейший триггер

нитроксидергической системы [23, 30]. Подобный холинергический механизм высвобождения оксида азота имеет место в интрамуральных нейронах других внутренних органов [1]. Следовательно, образование этого химического соединения интрамуральными холинергическими нейронами является общей закономерностью, которой лишены нейроны ганглиев пограничного симпатического ствола [5].

Таким образом, данные исследований последнего времени показывают, что функция оксида азота в нейронах органов пищеварения тесно связана с другими биологически активными веществами, а в ряде случаев опосредуется ими.

Нервный аппарат органов пищеварения, начиная с пищевода и заканчивая прямой кишкой, локализован в двух интрамуральных сплетениях: межмышечном — Ауэрбаха и в более слабо развитом подслизистом — Мейснера (рис. 1,2). Отношение нитроксидергических нейронов к общему числу нервных клеток в этих сплетениях у животных и человека имеет некоторые видовые различия [6].

У человека в пищеводе нейронов, синтезирующих нитроксид, оказалось 80%, а у крысы несколько больше — 89%. Однако размеры ганглиев, величина нейронов человека превосходят соответствующие показатели крысы. Нейроны с максимальным профилем поля от 1066 мкм<sup>2</sup> до 1371 мкм<sup>2</sup> зарегистрированы только у человека. Самые крупные нейроны крысы имеют профильное поле размером 700-900 мкм<sup>2</sup>. У человека не зарегистрированы нервные клетки меньше 250 мкм<sup>2</sup>, в то время как у крысы нейроны малой величины имеют профильное поле в 149-166 мкм<sup>2</sup>.

В 12-перстной кишке нитроксидергических нейронов у человека 70%, кошки — 77%, крысы — 67%. Подавляющее число нейронов у всех исследованных видов имеют профильное поле средней (400-600 мкм<sup>2</sup>) и малой (150-300 мкм<sup>2</sup>) величины. В прямой кишке у человека 74%, а у кошки 67% нитроксидергических нейронов. У человека размеры нейронов прямой кишки примерно соответствуют их размерам в пищеводе. У кошки крупных нейроцитов нет, преобладают клетки средней величины.

Подавляющее большинство нитроксидергических нейронов I типа имеют короткие дендриты и длинный аксон, который удается проследить до иннервируемого объекта (рис. 1, а, б; 2, в, г). В меньшем числе отмечены клетки II типа (главным образом в 12-перстной кишке), где согласно морфологическим исследованиям [4] они имеются в подавляющем большинстве (рис. 1, в, г).

В органах пищеварения много мелких нейронов. Их относят к VI типу, мини-нейронам и нитевидным нейронам [9,20,28]. В кишечнике свиней и морских свинок клетки VI типа и мини-нейроны являются нитроксидергическими и рассматриваются как моторные, в то время как нитевидные клетки оксида азота не синтезируют. Самые мелкие нитроксидергические нейроны человека, кошки и крысы с профильным

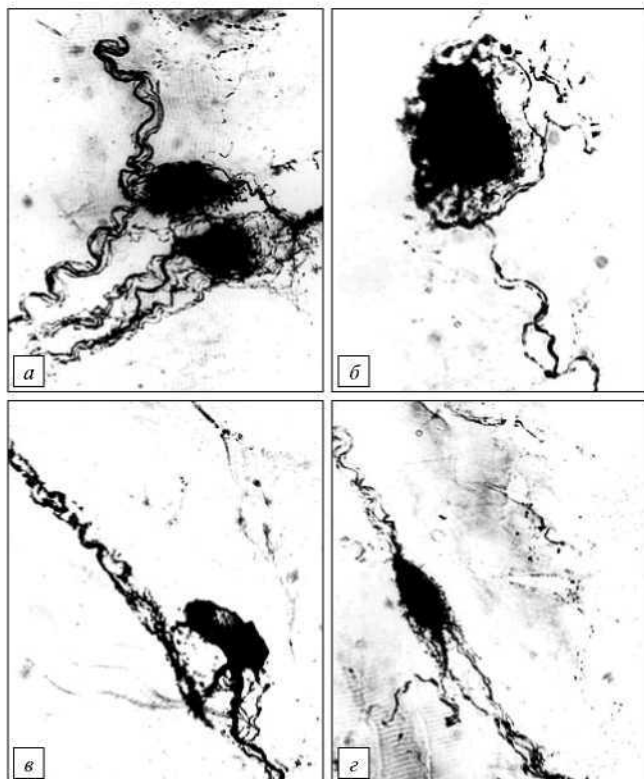


Рис. 1. Вегетативные нитроксидаэргические нейроны ауэрбаховского сплетения.\*

*а* — два нейрона I типа Догеля пищевода крысы с конвергирующим на них преганглионарным волокном блуждающего нерва. Вокруг тел нейронов тонкопетлистое сплетение с синаптическими терминалями; *б* - нейроны I типа Догеля пищевода человека с короткими ламеллярными дендритами, перинуклеарным аппаратом и аксоном; *в* — нейрон II типа Догеля 12-перстной кишки крысы, имеющий несколько аксонов; *г* - нейрон II типа Догеля 12-перстной кишки крысы, образующий несколько аксонов.

Метод на NADPH-диафоразу,  $\times 1000$ .

полем менее  $300 \text{ мкм}^2$  также следует отнести к VI типу и мини-нейронам, участвующим в регуляции подвижности кишечника.

Нейроны — это клетки, синтезирующие конститутивную форму нейрональной нитрооксидсинтазы. Во всех нейронах пищеварительных органов ее активность достаточно высока. В пищеводе самая высокая активность фермента отмечена у человека, в 12-перстной и в прямой кишке у кошки [6].

Аксоны нитроксидаэргических нейронов из ауэрбаховского сплетения поднимаются до уровня собственной пластинки слизистой оболочки, местами достигают базальной мембраны и стелются по основанию эпителиоцитов. Роль оксида азота может быть разнообразной: от поддержания структурно-функциональной целостности этих клеток, до регуляции их специфических функций. В частности, нитроксидаэргические аксоны иннервируют железистый эпителий. Они располагаются на стенках простых трубчатых желез слизистой оболочки пищевода и либеркюновых крипт тонкого и толстого кишечника, контактируя веретеновидными утолщениями с бокаловидными клетка-

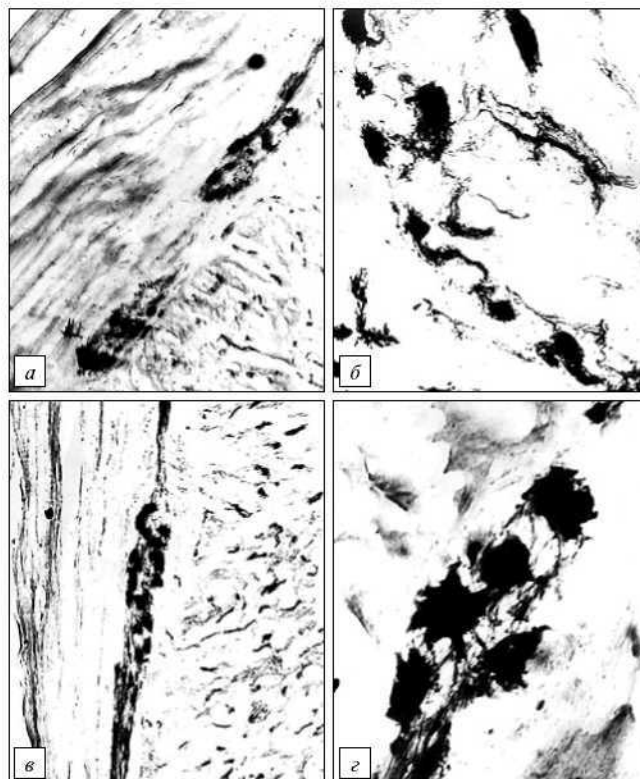


Рис. 2. Энтеральные нитроксидаэргические нейроны.

*а* - ауэрбаховское сплетение с интрамуральными ганглиями тонкой кишки крысы; *б* - интрамуральный ганглий ауэрбаховского сплетения тонкой кишки человека; *в* — ауэрбаховское сплетение толстой кишки человека; *г* — интрамуральный ганглий с нейронами I типа Догеля ауэрбаховского сплетения толстой кишки человека.

Метод на NADPH-диафоразу, *а*, *в* -  $\times 100$ , *б* -  $\times 400$ , *г* -  $\times 1000$ .

ми, апикально-зернистыми клетками Панета и базально-зернистыми эндокриноцитами Кульчицкого. В прямой кишке бокаловидные слизистые клетки густо покрыты веретеновидными аксонами. Нитроксидаэргический аксон секретирует оксид азота не только в местах веретеновидных утолщений, но и на всем протяжении. Подобным же образом иннервированы секреторные клетки желез подслизистой оболочки пищевода и 12-перстной кишки.

Исследована роль оксида азота в регуляции желудочной секреции. Ингибитор нитрооксидсинтазы L-NAME дозозависимо увеличивает секрецию гидрокарбоната. Базальная продукция нитрооксида поддерживает в покое тоническое напряжение стенки желудка и угнетает его секрецию [12, 25]. В главных клетках выработка пепсиногена в ответ на лейкотриены подавляется при введении L-NAMA на 50-60%. Следовательно, стимулирующий эффект лейкотриенов частично опосредован высвобождением оксида азота. Эти данные позволяют предположить наличие механизма, способного при участии нитрооксида ограничивать гиперсекрецию соляной кислоты [3].

Оксид азота регулирует продукцию слизи и дипептидаз кишечника, поддерживает морфологическую целостность слизистой оболочки, определяет абсолютную ее защиту в реакциях воспаления. Однако его протекторная роль зависит от множества

\* Фотографии в статье с препаратов Н.Е. Романовой.

факторов: характера внешних воздействий, а также от эффектов воспалительных медиаторов [11, 18].

Ворсинка — это основная структурно-функциональная единица тонкой кишки, обладающая пищеварительной и всасывательной функциями (рис. 3, а, б). Для скорости пристеночного пищеварения и всасывания абсолютное значение имеет высокая подвижность кишечных ворсинок и микроворсинок. Около 5 тыс. микроворсинок столбчатого эпителиоцита содержат конститутивную нейрональную нитроксидсинтазу. Гладкие миоциты основания микроворсинки получают нитроксидагические аксоны от нейронов мышечного сплетения. Экспрессия оксида азота обеспечивает аутокринный механизм подвижности для микроворсинок и паракринный для кишечных ворсинок. Продукты гидролиза пищи специфически влияют на синтазу щеточной каемки 12-перстной, тощей и подвздошной кишки, определяют избирательную и топографическую разобщенность всасывания аминокислот, жирных кислот и углеводов, повышают секрецию оксида азота по орально-каудальному градиенту.

Нитроксидагическая иннервация микроциркулярного русла установлена во всех органах пищеварительной системы. Эндотелиоциты кровеносных сосудов имеют конститутивную нитроксидсинтазу и способны продуцировать это соединение. Как известно, их релаксация под влиянием оксида азота была первым достоверно установленным фактом нитроксидагической регуляции [16]. В желудочно-кишечном тракте оксид азота контролирует релаксацию кровеносных сосудов микроциркулярного русла с помощью ауто- и паракринного механизмов, обеспечивает нормальное кровоснабжение мышечных и железистых клеток в периоды интенсивной эвакуаторной и секреторной деятельности. Оптимальный приток крови особенно важен, как уже указывалось, в период активного всасывания мономеров ворсинками кишечника [19].

Таким образом, кровеносные сосуды органов пищеварения получают оксид азота по меньшей мере из двух источников. Одним из них является собственный эндотелий, другим — аксоны нитроксидагических нейронов. На гладких мышечных клетках они не образуют синапсов и оказывают свое влияние с помощью диффузной или объемной нейротрансмиссии [5].

Все клетки экто- и эндодермального происхождения способны синтезировать оксид азота [2]. Этим свойством обладает и весь эпителиальный пласт пищевода. В 12-перстной кишке высокая активность NADPH-диафоразы сосредоточена полностью в апикальной части столбчатых эпителиоцитов, главным образом в щеточной каемке, т.е. там, где совершается мембранное пищеварение (рис. 3, а, б). Эта же область ответственна и за процессы всасывания. В прямой кишке, наоборот, нитроксидсинтаза сосредоточена в базальной части бокаловидных клеток — там, где располагаются органеллы, обеспечивающие образование мукоидного секрета (рис. 3, в, г).

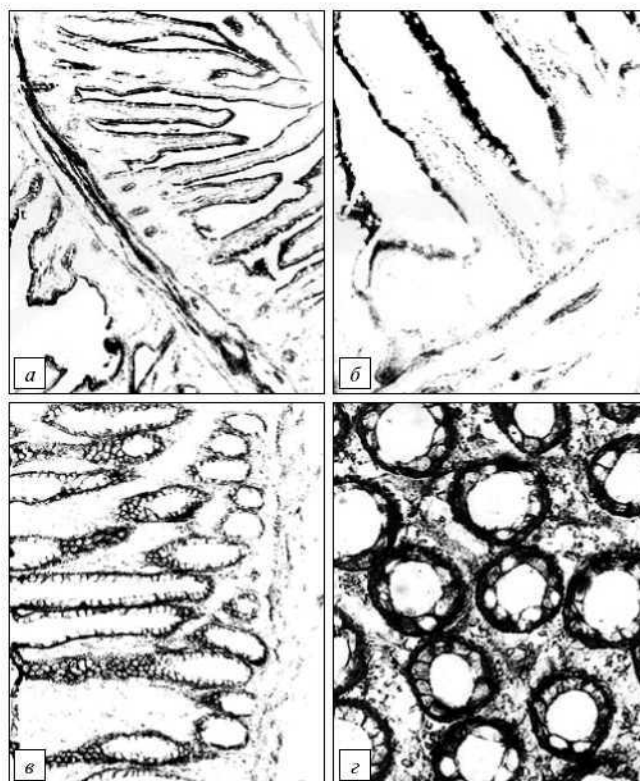


Рис. 3. Нитроксидсинтаза в эпителиоцитах кишечника человека.

а — ворсинки тонкой кишки с локализацией фермента в апикальной части столбчатых энтероцитов; б — ворсинки в увеличенном виде, четко видна нитроксидпозитивная каемка энтероцитов; в — слизистая оболочка прямой кишки в продольном разрезе, г — в поперечном разрезе, энтероциты крипт содержат фермент в апикальной и пограничной зонах.

Метод на NADPH-диафорузу, а, в -  $\times 200$ , б, г -  $\times 400$ .

В содержании нитроксидсинтазы имеются некоторые видовые различия. В пищеводе у крыс активность NADPH-диафоразы в два раза выше, чем у человека, а в 12-перстной кишке наблюдаются обратные соотношения. У человека и кошки показатели активности фермента в эпителиоцитах ворсинок различаются. В прямой кишке активность диафоразы у человека выше на 27%. Имеющиеся различия не следует, очевидно, считать постоянными. Они являются функциональными и временными и, по всей вероятности, отражают разный уровень работы отделов пищеварительного аппарата.

Органы пищеварительной системы обладают высокой подвижностью. Они имеют по всей длине наружный мышечный слой и мышечную пластинку слизистой оболочки, образованные (за исключением верхней трети мышечного слоя пищевода) из гладких миоцитов. Все они получают обильную нитроксидагическую иннервацию, главным образом от нейронов I типа Догеля, локализованных в ауэрбаховом сплетении (рис. 4, а, б). Терминальные отделы аксонов имеют мелкие веретеновидные утолщения, интенсивно окрашивающиеся при реакции на NADPH-диафорузу. Аксоны включают миоциты в широкопетлистую гранулярную сеть. Преформированных эффекторных терминалей на гладких мышечных

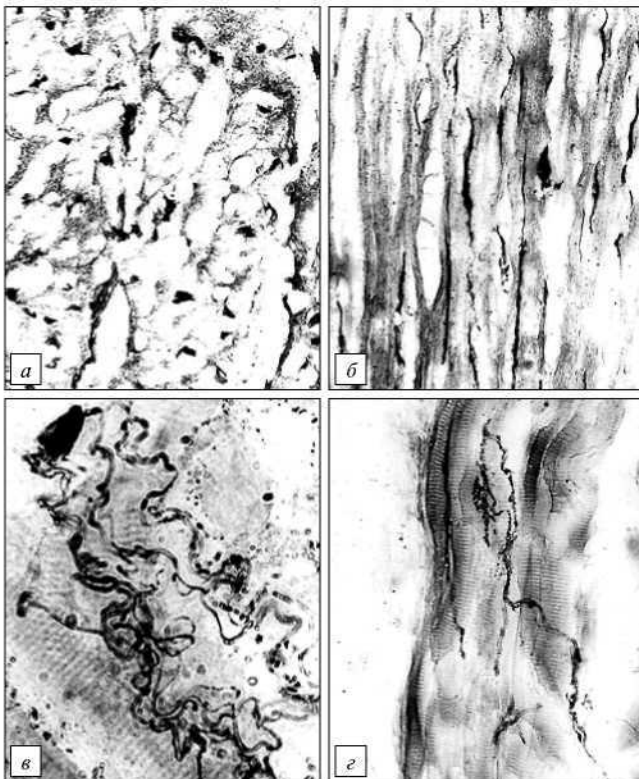


Рис. 3. Нитроксидагическая иннервация мышц.

*а* — поперечный и продольный (*б*) срезы мышцы тонкой кишки человека, пучки и отдельные аксоны в поперечном и продольном слоях наружной мышечной оболочки; *в* — нейрон, иннервирующий поперечно-полосатые мышечные волокна пищевода крысы; *г* — нервное окончание на поперечно-полосатом мышечном волокне пищевода крысы.

Метод на NADPH-диафоразу,  $\times 400$ .

клетках не найдено. Вероятно, для всех миоцитов существует диффузная (объемная) нейротрансмиссия.

В регуляции тонуса гладких мышечных клеток, кроме паракринного нервного, принимает участие и аутокринный нитроксидагический механизм. Гладкие миоциты дают положительную реакцию на нейрональную нитроксидсинтазу. Наиболее высокая активность регистрируется в миоцитах 12-перстной и прямой кишки человека. Содержание фермента в миоцитах у кошки ниже, чем у человека (примерно наполовину). Миоциты крысы имеют наименьшую активность этого фермента.

Оксид азота не только солокализирован с другими биологически активными веществами, но и взаимодействует с ними в регуляции функции гладкой мышечной ткани. Оксид азота и VIP совместно, открывая калиевые каналы, усиливают релаксационный эффект миоцитов нижнего сфинктера пищевода животных [13, 14]. Оксид азота опосредует релаксацию мышцы толстой кишки, вызываемую серотонином. [3].

Установлено взаимодействие между простагландином E<sub>2</sub> и нитроксидом в релаксации гладкой мышечной ткани желудка. Усиливая активность циклооксигеназы, нитроксид первоначально увеличивает содержание PGE<sub>2</sub>, который в свою очередь стимулирует его образование [17]. Медь и цинк солокализированы в гладких миоцитах с нитроксидсинтазой. Они

способствуют синтезу оксида азота, расслабляющего гладкую мышцу [12]. Сходным эффектом обладает холецистокинин — гормон эпителиоцитов тонкого кишечника. Он повышает содержание конститутивной нитроксидсинтазы в период активной фазы пищеварения и способствует секреции нитроксида [33].

Наружная мышечная оболочка верхней трети пищевода образована поперечно-полосатыми волокнами. По структуре они полностью сходны со скелетными, но функционально от них отличаются. Эта произвольная мышца иннервирована вегетативными нейронами ауэрбаховского сплетения. В отличие от лейомиоцитов поперечно-полосатые волокна пищевода имеют нервные терминалы, сходные с двигательной бляшкой скелетного миона (рис. 4, в, г). Однако наличие в ее постсинаптическом компоненте скопления ядер, митохондрий и везикул L-системы, обязательных для скелетного волокна, не установлено [6].

При идентификации NADPH-диафоразы мышечное волокно пищевода приобретает от диформазанового преципитата поперечную исчерченность, указывающую на локализацию нитроксидсинтазы. Расстояние между окрашенными участками не превышает 2,5–2,7 мкм, т.е. равно величине саркомера. Очевидно, фермент заключен в Z-полоске. Следовательно, промежуточным звеном для передачи нервного импульса между ацетилхолином постганглионарного волокна и выходом Ca<sup>2+</sup> из цистерн L-системы служит оксид азота. Иначе говоря, механизм возбуждения поперечно-полосатого мышечного волокна сходен с механизмом возбуждения гладкого миоцита стенки кровеносного сосуда. Несмотря на многочисленные новые факты, проблема регуляции моторики пищевода, желудка и кишечника, особенно человека, остается актуальной и до конца не решенной [23].

Получены интересные результаты при изучении роли оксида азота в регуляции подвижности пищевода. Внутривенное введение больших доз нитроглицерина — 100–200 мкг/кг • час — большим с диффузным спазмом пищевода восстанавливало его нормальную перистальтику, что доказало связь данной патологии с нарушением синтеза эндогенного нитроксида. На этом основании был сделан вывод о том, что нервным медиатором, определяющим перистальтику пищевода и релаксацию его гладких и поперечно-полосатых мышц, может быть данное соединение. Спазмы в нижнем пищеводном сфинктере успешно снимались внутривенным введением ингибитора нитроксидсинтазы — нитро-L-аргинина [8].

Исследование в эксперименте различных доноров оксида азота и состояния гуанилатциклазной системы показали, что влияние ацетилхолина на мышечные клетки пищевода опосредовано через мускариновые рецепторы. Секретия нитроксида здесь происходит при обязательном участии ацетилхолина, который, как и в кровеносных сосудах, является фактором, запускающим всю нитроксидагическую систему. Внутриклеточное аутокринное действие оксида азота на

гладкие миоциты реализуется через гуанилатмонофосфат, который включает в цитоплазме специфические протеинкиназы [22, 23, 30].

Сходный механизм релаксации мышц установлен во внутреннем анальном сфинктере. Ингибиторы нитрооксидсинтазы снимают его спазм. Одновременное исследование пилорического сфинктера показало противоположные результаты. Иначе говоря, ингибиторы нитрооксидсинтазы не расслабляют гладкие мышцы пилорического сфинктера [7]. Эти данные полностью согласуются с исследованиями значения оксида азота для релаксации мышечной ткани сфинктеров пищевода, желудка и прямой кишки [15]. Проведено дифференцированное изучение типов нитрооксидсинтазы, образующих оксид азота. Оказалось, что релаксация гладких миоцитов в нижнем сфинктере пищевода и внутреннем анальном жо́ме опосредована нейрональной нитрооксидсинтазой [29].

Таким образом, органы пищеварительной системы имеют нитрооксидергическую иннервацию, которая участвует в регуляции моторики и секреции, в примембранном пищеварении и всасывании. Вся нитрооксидергическая регуляция обеспечивается ауто- и паракринными механизмами синтеза оксида азота интрамуральными нейронами энтеральной нервной системы, эпителием, выстилающим пищеварительную трубку, клетками мышечной ткани; эндотелием микрососудов. Однако в регуляции пищеварительной системы оксид азота не одинок. Гладкие миоциты он релаксирует совместно с VIP, соматостатином, нейропептидом и серотонином, его образованию способствуют холецистокинин, простагландин E<sub>2</sub>, лейкотриены, а выделению — ацетилхолин. Набор местных биологически активных веществ этим не исчерпывается. В органах пищеварения имеется большая группа регуляторных пептидов, взаимодействие оксида азота с которыми не изучено, но вполне вероятно.

#### Литература

1. Андреева Н.А., Шуматова Т.А., Мотавкин П.А.// БЭБиМ. - 2000. - №2. - С. 202-204.
2. Елисеева Е.В. Нитрооксидергическая регуляция легких. — Владивосток, 2001.
3. Ивашкин В. Т., Драпкин О.М. Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001.
4. Лаврентьев Б.И. Морфология автономной нервной системы. — М.: Медгиз, 1946.
5. Мотавкин П.А. Введение в нейробиологию. — Владивосток: Медицина ДВ, 2003.
6. Романова Н.Е. Гистохимические основы нитрооксидергической регуляции пищевода и кишечника: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Владивосток, 2004.
7. Belai A., Burnstock G.// *Neuroreport*. - 2000. - Vol. 17, No. 11. - P. 5-8.
8. Beyak M.J., Xue S., Collman P.I. et al.// *Gastroenterology*. - 2000. - Vol. 119, No. 2. - P. 77-385.

9. Brehmer A., Schrodi F., Neuhuber W., Timmermans J.-P.// *Anat. Embryol. Germany*. - 1999. - Vol. 199. - P. 57-62.
10. Brehmer A., Schrodi F., Neuhuber W.// *Anat. Embryol. Germany*. - 1999. - Vol. 200. - P. 125-135.
11. Calatayud S., Barrachina D., Esplugues J. V.// *Microsc. Res. Tech*. - 2001. - Vol. 53, No. 5. - P. 325-335.
12. Colpaert E.E., Timmermans J.P., Lefebvre R.A.// *Br. J. Pharmacol*. - 2002. - Vol. 135, No. 4. - P. 917-926.
13. Dick J.M., VanMolle W., Brouckaert P., Lefebvre R.A.// *J. Physiol*. - 2002. - Vol. 538, No. 1. - P. 133-143.
14. Ergun Y., Ogulener N.// *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2001. - Vol. 299, No. 3. - P. 945-950.
15. Fan Y.P., Chakder S., Gao F., Rattan S.// *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. - 2001. - Vol. 280, No. 1. - P. 32-42.
16. Furchgott R.F., Zawadski J.// *Nature*. - 1980. - Vol. 288. - P. 373-376.
17. Jimenez D., Martin M.J., Pozo D. et al.// *Dig. Dis. Sci*. - 2002. - Vol. 47, No. 1. - P. 44-53.
18. Kim H., Hwan Kim K.// *Pharmacology*. - 2001. - Vol. 62, No. 4. - P. 200-207.
19. Konturek S., Konturek P.// *Digestion*. - 1995. - Vol. 56. - P. 1-13.
20. Messenger J.B., Bornstein J.C., Furness J.B.// *Neuroscience*. - 1994. - Vol. 60. - P. 227-244.
21. Miller S.M., Reed D., Sarr M.G. et al.// *Neurogastroenterol. Motil*. - 2001. - Vol. 13, No. 2. - P. 121-131.
22. Nishizaki K., Nakao K., Ishii H. et al.// *Brain Res*. - 2003. - Vol. 965, No. 1-2. - P. 121-129.
23. Rast G.F.// *J. Exp. Biol*. - 2001. - Vol. 204, №. 21. - P. 3789-3801.
24. Schicho R., Schemann M., Pabst M.A. et al.// *Neurogastroenterol. Motil*. - 2003. - Vol. 15, No. 1. - P. 33-44
25. Shah S., Hobbs A., Singh R. et al.// *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. - 2000. - Vol. 279, No. 4. - P. 1478-1485.
26. Smid S.D., Blackshaw L.A.// *Auton. Neurosci.* — 2000. - Vol. 28, No. 86. - P. 30-36.
27. Smith V.C., Dhatt N., Buchan A.M.// *Can. J. Physiol. Pharmacol*. - 2001. - Vol. 79, No. 11. - P. 905-918.
28. Stach W.// *Verh. Anat. Ges.* - 1983. - Vol. 77. - P. 577-578.
29. Storr M., Geisler F., Neuhuber W.L. et al.// *Auton. Neurosci.* - 2001. - Vol. 13, No. 91[1-2]. - P. 1-9.
30. Takahashi T.// *J. Gastroenterol.* - 2003. - Vol. 38, No. 5. - P. 421-430.

Поступила в редакцию 02.03.04.

#### NITRIC OXIDE IN ORGANS OF DIGESTIVE SYSTEM

P.A. Motavkin

Vladivostok State Medical University

*Summary* — This paper provides a literary review devoted to the study of nitric oxide involvement in regulation of the digestive system functions. While discussing the role of different cells (myocytes, enterocytes, neurocytes) in producing the nitric oxide and regulating its synthesis, the author emphasizes the function of other biologically active substances in these processes. Furthermore, inside the organs of the digestive system there is a large group of regulatory peptides, which interaction with the nitrogen oxide has not been examined up to now.

*Pacific Medical Journal*, 2004, No. 2, p. 13-17.