



Оригинальная статья/Research article

## Критические точки производства полимерных микросфер, используемых в рентгенохирургии

Т. А. Биткина<sup>1,2\*</sup>, А. В. Басевич<sup>1</sup>, В. М. Родин<sup>3</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14

2 – ООО «Фарма Ген», 194064, Россия, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4А

3 – ООО «Сфера-Спектр», 195027, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Пороховская, д. 7А

\***Контактное лицо:** Биткина Татьяна Александровна. **E-mail:** [tatiana.bitkina@pharminnotech.com](mailto:tatiana.bitkina@pharminnotech.com)

**ORCID:** Т. А. Биткина – <https://orcid.org/0000-0002-6253-0213>; А. В. Басевич – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>; В. М. Родин – <https://orcid.org/0000-0001-9399-0979>.

**Статья поступила:** 20.05.2020. **Статья принята в печать:** 21.08.2020. **Статья опубликована:** 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Насыщаемые полимерные микросферы представляют собой одну из передовых разработок в области химиоэмболизации. В связи со сложным многоэтапным производством на российском рынке представлены в основном зарубежные производители данных изделий, что может свидетельствовать об актуальности изучения данной тематики.

**Цель.** Целью работы была разработка технологической схемы производства полимерных микросфер и описание критических контрольных точек производства.

**Материалы и методы.** Исследование полупродукта осуществлялось при помощи микроскопа Levenhuk D320L (Levenhuk Inc., США). Анализ контрольных точек производства проводился методом ХАССП (НАССР (Hazard analysis and critical control points)).

**Результаты и обсуждения.** В результате исследования выявлены и описаны основные технологические стадии производства микросфер, представляющих собой сополимер винилового спирта и акрилата натрия. Для каждой технологической стадии определены контрольные критические точки с указанием контролируемых параметров и методов контроля. Приведены фотографии полупродукта на промежуточных стадиях.

**Заключение.** Разработана технологическая схема производства микросфер. Проведен анализ критических контрольных точек стадий основного процесса производства. Выявлены необратимые критические точки производства.

**Ключевые слова:** полимерные микросферы, критические точки, технологическая схема, эмболизация, эмболизирующий материал, химиоэмболизация.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Т. А. Биткина, А. В. Басевич – авторы идеи. Т. А. Биткина – разработка технологической схемы производства полимерных микросфер. Т. А. Биткина, В. М. Родин – определение и анализ контрольных критических точек производства микросфер. В. М. Родин – получение и физико-химический анализ микросфер. Т. А. Биткина, А. В. Басевич – написание текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность компании ООО «Фарма Ген» в лице директора Александра Александровича Резяпкина за содействие при проведении исследований.

**Для цитирования:** Биткина Т. А., Басевич А. В., Родин В. М. Критические точки производства полимерных микросфер, используемых в рентгенохирургии. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2020;9(3):28–35. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-28-35>

## Critical Points for the Production of Polymeric Microspheres Used in X-Ray Surgery

Tatyana A. Bitkina<sup>1,2\*</sup>, Anna V. Basevich<sup>1</sup>, Viktor M. Rodin<sup>3</sup>

1 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

2 – LLC «Pharma Gene», 4A, Tikhoretsky av., Saint-Petersburg, 194064, Russia

3 – LLC «Sfera-Spektr», 7A, Bolshaya Porokhovskaya str., Saint-Petersburg, 195027, Russia

\***Corresponding author:** Tatyana A. Bitkina. **E-mail:** [tatiana.bitkina@pharminnotech.com](mailto:tatiana.bitkina@pharminnotech.com)

**ORCID:** Tatyana A. Bitkina – <https://orcid.org/0000-0002-6253-0213>; Anna V. Basevich – <https://orcid.org/0000-0002-6864-6794>; Viktor M. Rodin – <https://orcid.org/0000-0001-9399-0979>.

**Received:** 20.05.2020. **Revised:** 21.08.2020. **Published:** 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** Saturated polymer microspheres represent one of the leading developments in the field of chemoembolization. Due to the complicated multi-stage production in the Russian market, mainly foreign manufacturers of these products are represented, which may indicate the relevance of studying this topic.

**Aim.** The aim of the work was to develop a technological scheme for the production of polymer microspheres and a description of critical control points of production.

**Materials and methods.** The study of the intermediate product was carried out using a Levenhuk D320L microscope (Levenhuk Inc, USA). Analysis of production control points was carried out by the HACCP (Hazard analysis and critical control points) method.

**Results and discussion.** As a result of the study, the main technological stages of the production of microspheres, which are a copolymer of vinyl alcohol and sodium acrylate, have been identified and described. For each technological stage, control critical points are determined with an indication of the controlled parameters and control methods. The photographs of the intermediate product at intermediate stages are shown.

**Conclusion.** A technological scheme for the production of microspheres has been developed. The analysis of critical control points of the stages of the main production process is carried out. Identified irreversible critical points of production.

**Keywords:** polymer microspheres, critical points, flow chart, embolization, embolizing material, chemoembolization.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Tatyana A. Bitkina, Anna V. Basevich – authors of the idea. Tatyana A. Bitkina – development of a technological scheme for the production of polymer microspheres. Tatyana A. Bitkina, Viktor M. Rodin – determination and analysis of control critical points for the production of microspheres. Viktor M. Rodin – preparation and physico-chemical analysis of microspheres. Tatyana A. Bitkina, Anna V. Basevich – writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

**Acknowledgment.** The authors express their gratitude to the Pharma Gene LLC company represented by the director Aleksander Aleksandrovich Rezyapkin for assistance in conducting research.

**For citation:** Bitkina T. A., Basevich A. V., Rodin V. M. Critical points for the production of polymeric microspheres used in X-Ray surgery. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration.* 2020;9(3):28–35. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-28-35>

## ВВЕДЕНИЕ

Транскатетерная артериальная химиоэмболизация является широко применяемым методом для лечения неоперабельных опухолевых процессов [1]. В основе химиоэмболизации лежит процесс локального введения в артерии эмболического материала, насыщенного противоопухолевым лекарственным средством [2]. Выделяют два основных метода: *масляная химиоэмболизация и химиоэмболизация микросферами.*

Масляные рентгеноконтрастные препараты представляют собой сложные эфиры жирных кислот. В настоящее время широко применяется Липидол®, представляющий собой йодированный сложный эфир, получаемый из масла маковых зерен [3, 4]. Процедура с использованием данных препаратов позволяет поддерживать достаточно высокие концентрации химиопрепарата в опухоли, но лекарственное средство удерживается носителем непродолжительное время (до нескольких часов), кроме того, такие препараты не способны вызывать длительную или необратимую эмболизацию сосудов и нередко тяжело переносятся пациентами, вызывая сильные боли [1, 5].

Одной из последних разработок в области химиоэмболизации стали насыщаемые микросферы. Известные микросферы отрицательно заряжены и могут поглощать различные лекарственные средства с помощью таких механизмов, как ионный обмен или абсорбция. Данный вид эмболического материала позволяет доставить препарат к опухоли, произвести окклюзию сосудов и обеспечить продолжительное контролируемое высвобождение препарата при минимальном выбросе в системный кровоток [6]. По сравнению с масляными эмболическими материалами полимерные микросферы способны высвобождать лекарственное средство в течение длительного времени (не менее месяца), вместе с этим обеспечивая

полное прекращение кровоснабжения злокачественного новообразования [1, 3, 4, 7].

В связи с многоэтапным и сложным процессом производства микросфер в данный момент на Российском рынке представлено всего несколько зарегистрированных изделий. В основном это импортные эмболизирующие микросферы, которые производятся во Франции, Великобритании и США, и только один производитель является отечественным [8].

**Цель настоящего исследования** – разработка технологической схемы производства полимерных микросфер и описание критических контрольных точек производства.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования стали полимерные микросферы, представляющие собой сополимер винилового спирта и акрилата натрия. Исследование полупродукта на контрольных точках осуществлялось при помощи микроскопа Levenhuk D320L (Levenhuk Inc., США). Анализ контрольных точек производства проводился методом ХАССП (НАССР (Hazard analysis and critical control points)). Согласно Серии технических отчетов ВОЗ № 908 (2003 г.) ХАССП является систематизированным методом выявления, оценки и контроля рисков. Главная концепция данного метода заключается в обеспечении безопасности фармацевтических препаратов [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап исследования заключался в разработке и анализе технологической схемы производства микросфер (рисунок 1). Далее были определены критические стадии. На технологической схеме они обозначены серым цветом.

На втором этапе были определены критические контрольные точки производства стадий основного технологического процесса (таблица 1).

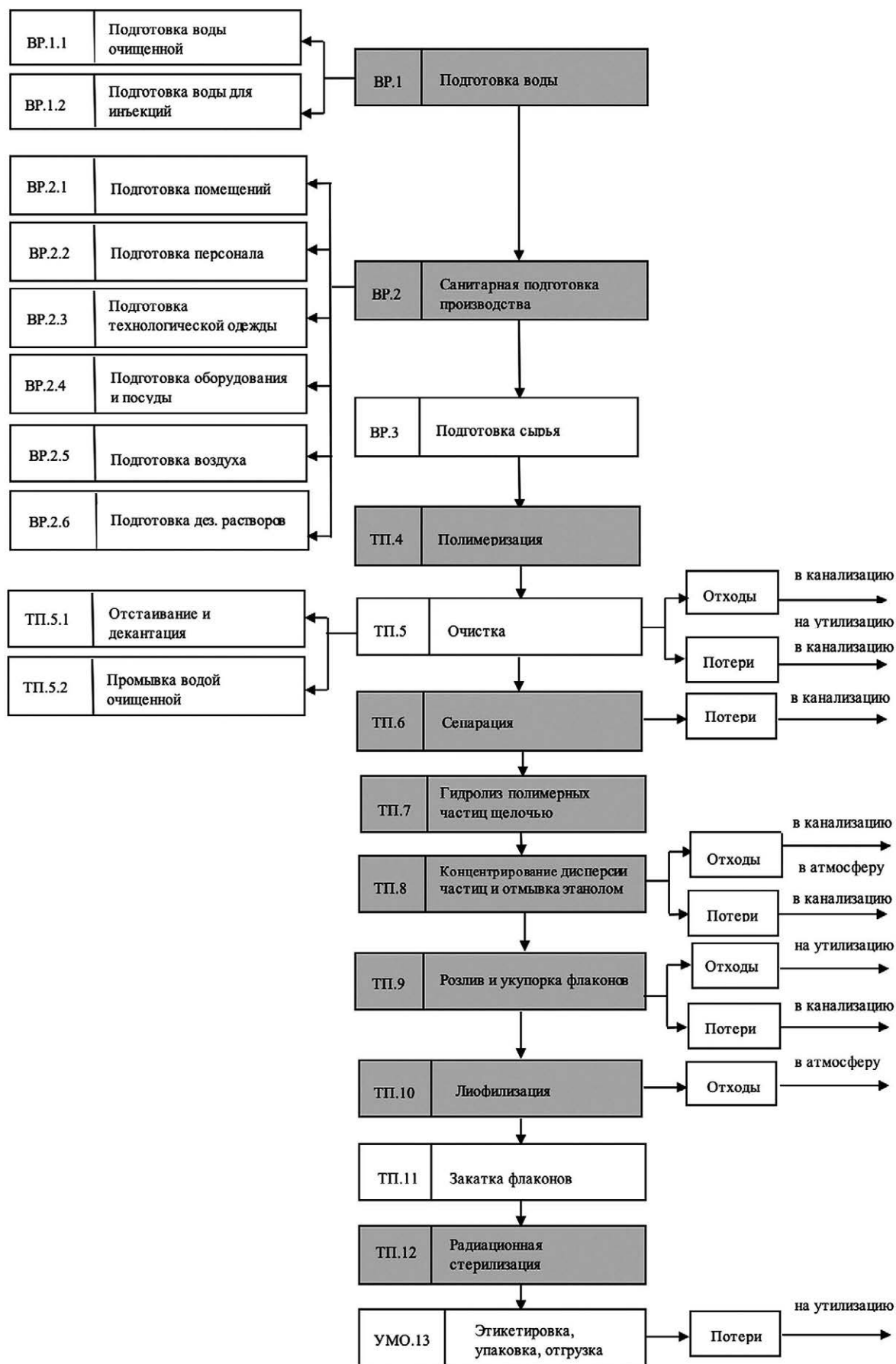


Рисунок 1. Технологическая схема производства микросфер

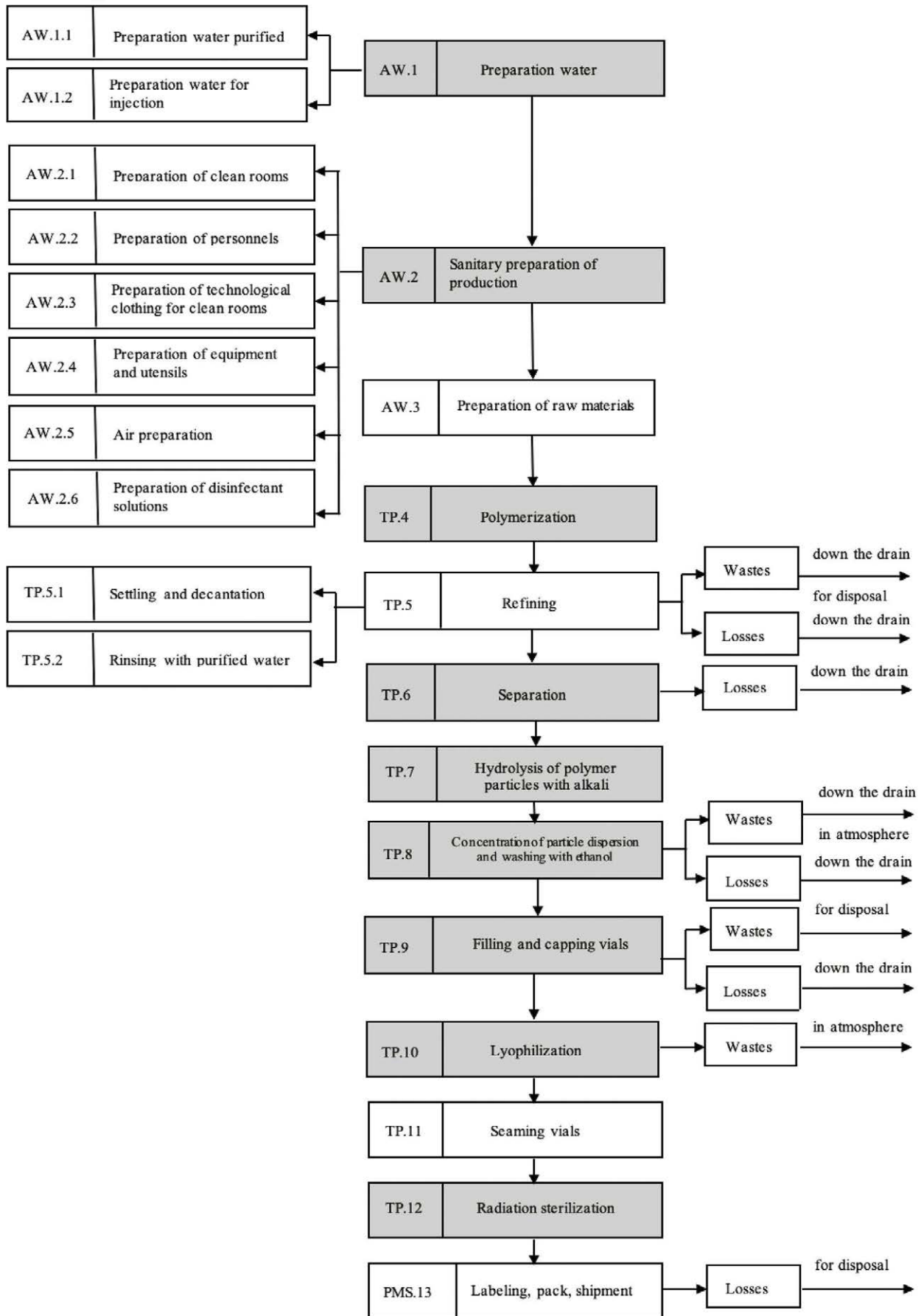


Figure 1. The technological scheme of the production of microspheres

Таблица 1. Критические контрольные точки стадий основного процесса производства микросфер

Table 1. Critical milestones in the stages of the main microsphere manufacturing process

Наименование операции Stage or operation name	Критические контрольные точки Critical control point	Значения контролируемых параметров Values of monitored parameters	Методы контроля Control methods
ТП.4 «Полимеризация» TP.4 «Polymerization»	Температура реакционной массы Reaction mass temperature	68–72 °C	Контактная термометрия Contact thermometry
	Скорость перемешивания Stirring speed	В соответствии с технической спецификацией In accordance with technical specification	Контроль при помощи датчика мешалки Control by stirrer sensor
	Внешний вид частиц Particle appearance	Сферическая форма, целостность частиц, частицы не слипаются между собой Spherical shape, particle integrity, particles do not stick together	Микроскопия Microscopy
ТП.6 «Сепарация» TP.6 «Separation»	Размер частиц Particle size	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	Микроскопия Microscopy
ТП.7 «Гидролиз полимерных частиц щелочью» TP.7 «Hydrolysis of polymer particles with alkali»	Внешний вид частиц Particle appearance	Сферическая форма, целостность частиц Spherical shape, particle integrity	Микроскопия Microscopy
	Размер частиц Particle size	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	
ТП.8 «Концентрирование дисперсии частиц и отмывка этанолом» TP.8 «Concentration of the dispersion of particles and washing with ethanol»	Насыщаемость Saturability	Равномерное насыщение доксорубицином Uniform saturation with doxorubicin	Микроскопия Microscopy
	Внешний вид частиц Particle appearance	Частицы не слипаются между собой, отсутствуют побочные продукты синтеза Particles do not stick together, there are no synthesis by-products	
	Сорбционная емкость Sorption capacity	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	Спектрофотометрия Spectrophotometry
ТП.9 «Розлив и укупорка флаконов» TP.9 «Filling and capping vials»	Объем наполнения Filling volume	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	Калиброванный шприц Calibrated syringe
ТП.10 «Лиофилизация» TP.10 «Lyophilization»	Внешний вид частиц Particle appearance	Сферическая форма, целостность частиц Spherical shape, particle integrity	Микроскопия Microscopy
	Насыщаемость Saturability	Равномерное насыщение доксорубицином Uniform saturation with doxorubicin	Микроскопия Microscopy
	Сорбционная емкость Sorption capacity	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	Спектрофотометрия Spectrophotometry
ТП.12 «Радиационная стерилизация» TP.12 «Radiation sterilization»	Стерильность Sterility	Стерильность Sterility	В соответствии с ГФ XIV According SP XIV
	Пирогенность Pyrogenicity	Апирогенность Apyrogenicity	В соответствии с ГФ XIV According SP XIV
	Внешний вид частиц Particle appearance	Сферическая форма, целостность частиц Spherical shape, particle integrity	Микроскопия Microscopy
	Насыщаемость Saturability	Равномерное насыщение доксорубицином Uniform saturation with doxorubicin	Микроскопия Microscopy
	Сорбционная емкость Sorption capacity	В соответствии с требованиями спецификации According to specification requirements	Спектрофотометрия Spectrophotometry

На стадии ТП.4 «Полимеризация» в течение всего синтеза контролируют температуру и скорость перемешивания реакционной массы, состоящей из винилацетата, метилакрилата и диакрилатдиола [10],

поскольку эти факторы напрямую влияют на форму образующихся частиц и их размер.

Температура реакционной массы не должна превышать температуру кипения мономеров, участвую-

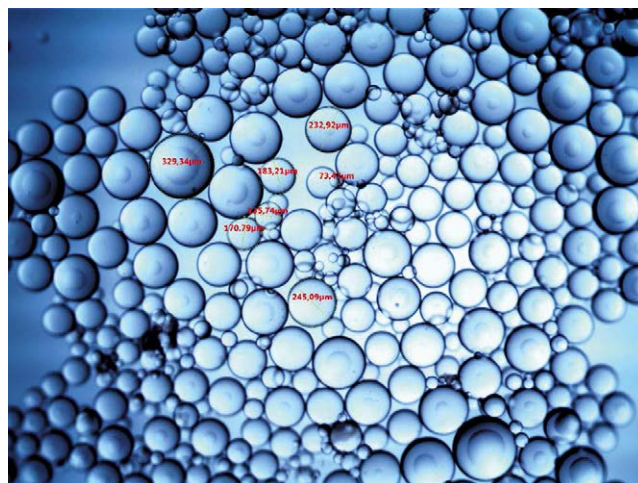
ших в синтезе. При несоблюдении данного параметра и, соответственно, закипании хотя бы одного из мономеров, образующиеся частицы будут иметь пористую неоднородную структуру. При продолжительном отклонении температуры реакционная масса на выходе из стадии может представлять собой слипшийся агломерат. Поскольку самым легкокипящим мономером в исследуемом способе получения микросфер является винилацетат, значение температуры реакционной массы не должно превышать 72 °С. При температуре ниже 68 °С снижается скорость разложения инициатора, что приводит к низкому выходу конечного продукта.

Реакционная масса представляет собой эмульсию смеси мономеров и инициатора в воде, скорость перемешивания которой влияет на размер образующихся капель и, следовательно, размер образующихся микросфер. Чем выше скорость перемешивания, тем меньше размер частиц и наоборот. Однако в случае слишком медленного перемешивания капли могут не образовываться, вследствие чего не образуются и микросферы.

В результате синтеза получают водную дисперсию смеси полимерных частиц, содержащих функциональные сложноэфирные группы, в широком размерном диапазоне и побочных продуктов реакции полимеризации [10]. В конце синтеза осуществляют контроль внешнего вида полимерных частиц (рисунок 2).

На стадии ТП.5 «Очистка» осуществляют очистку продукта сополимеризации от непрореагировавших мономеров и вспомогательных веществ путем отстаивания с последующей промывкой водой очищенной [10].

На стадии ТП.6 «Сепарация» производят разделение микросфер по размерным диапазонам при помощи металлических калиброванных сит. В конце данной стадии каждый размерный ряд методом мик-

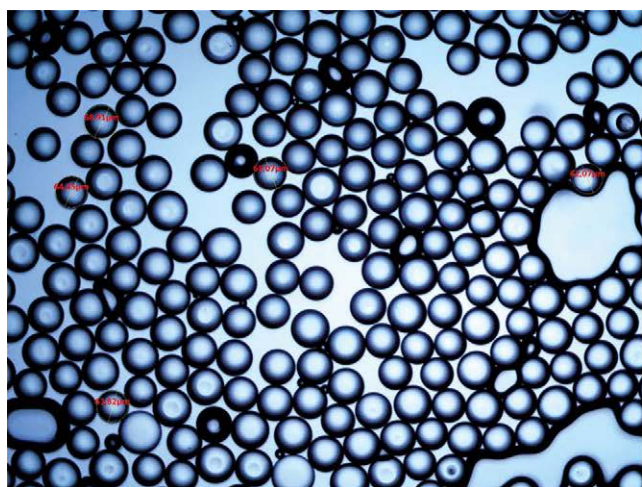


**Рисунок 2.** Микросферы, полученные на стадии ТП.4 «Полимеризация»

**Figure 2.** Microspheres obtained at the stage of TP.4 «Polymerization»

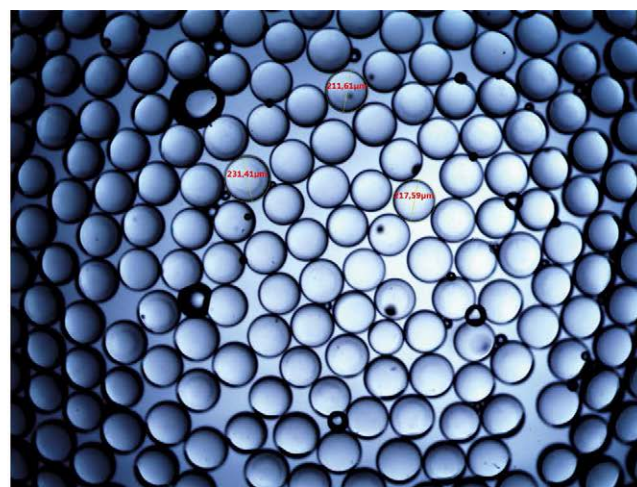
роскопии контролируют на наличие слишком мелких и слишком крупных частиц. После чего выборочно определяют размер частиц при помощи программного обеспечения микроскопа (рисунок 3). При обнаружении частиц, не соответствующих размерному ряду, сепарацию проводят повторно.

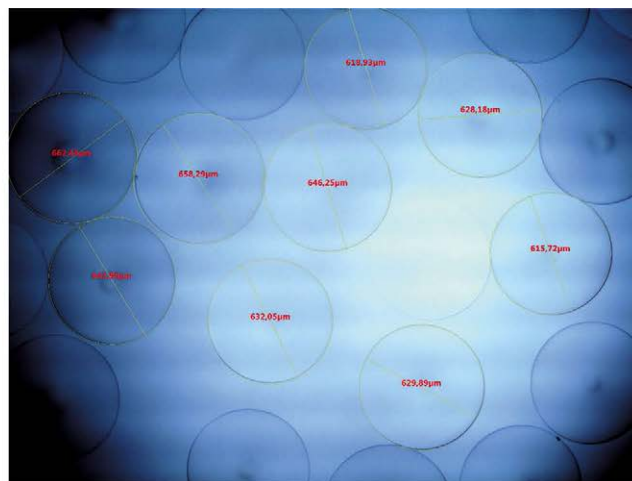
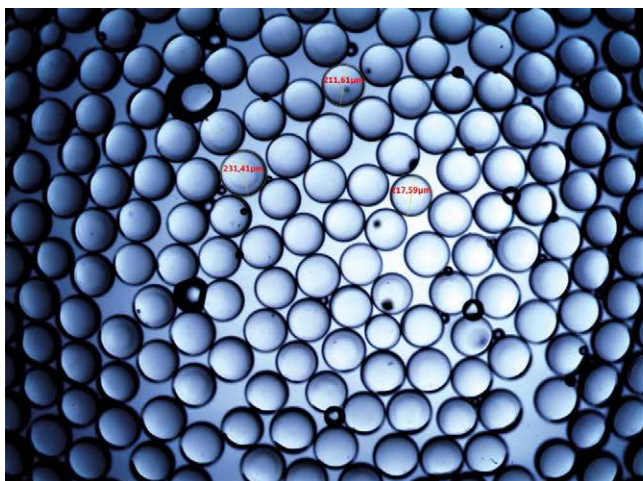
На стадии ТП.7 «Гидролиз полимерных частиц щелочью» сложноэфирные группы микросфер переводят в функциональные карбоксилатные группы в солевой форме, что обеспечивает дальнейшую возможность насыщения микросфер лекарственным препаратом [10]. В конце стадии осуществляют контроль внешнего вида частиц и степень их насыщенности раствором хлорида натрия (рисунок 4). При насыщении микросферы должны увеличиваться в диаметре в 3–4 раза и становиться эластичными. Если гидролиз прошел частично, насыщенность микросфер снижается, как следствие рабочий раз-



**Рисунок 3.** Микросферы, полученные на стадии ТП.6 «Сепарация»

**Figure 3.** Microspheres obtained at TP.6 «Separation stage»



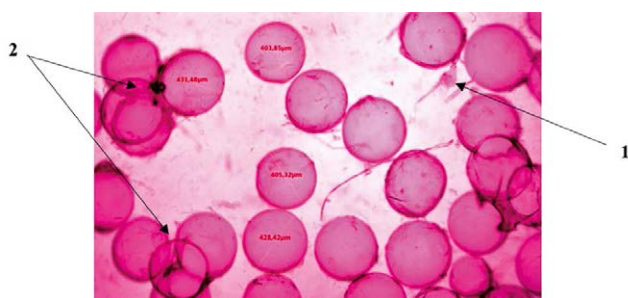


**Рисунок 4.** Микросферы, полученные на стадии ТП.7 «Гидролиз полимерных частиц щелочью» (слева – до насыщения раствором хлорида натрия; справа – после насыщения раствором хлорида натрия)

**Figure 4.** Microspheres obtained at the stage TP.7 «Hydrolysis of polymer particles with alkali» (on the left – before saturated with sodium chloride solution; on the right – after saturation with sodium chloride solution)

мер (размер микросфер в насыщенном состоянии) не соответствует требованиям нормативной документации.

На стадии ТП.8 «Концентрирование дисперсии частиц и отмывка этанолом» производят отмывку микросфер от избытка щелочи и продуктов гидролиза. На выходе получают этанольную дисперсию микросфер [10]. При помощи микроскопии контролируют качество отмывки, внешний вид микросфер и равномерность их насыщаемости доксорубицином. При недостаточной очистке доксорубицин окрашивает не только микросферы, но и загрязнения органического характера (поз. 1, рисунок 5). При наличии органических загрязнений микросферы могут слипаться между собой, образуя агломераты (поз. 2, рисунок 5).



**Рисунок 5.** Недостаточная очистка микросфер

**Figure 5.** Inadequate microsphere cleaning

Далее контролируют сорбционную емкость микросфер при помощи спектрофотометрии. При недостаточной очистке органические загрязнения абсорбируют часть лекарственного средства, вследствие чего сорбционная емкость микросфер снижается. Если данный показатель не соответствует норма-

тивной документации, отмывку продукта этанолом повторяют.

После стадии ТП.8 микросферы передают в чистые помещения для первичной упаковки. Изучены два способа фасовки микросфер в первичную упаковку. В первом случае после ТП.8 «Концентрирование дисперсии частиц и отмывка этанолом» полупродукт лиофилизируют на поддонах, после чего лиофилизат фасуют во флаконы. В данном способе фасовка затрудняется из-за электростатичности микросфер. Во втором случае микросферы после стадии ТП.8 заливают водно-спиртовым раствором, полученную суспензию дозируют во флаконы с последующей укупоркой резиновыми пробками. В процессе розлива осуществляют контроль объема наполнения при помощи градуированного шприца.

Далее флаконы с жидкой водно-этанольной дисперсией перемещают в лиофильную сушилку и задают программу в соответствии с техническим заданием. После лиофилизации осуществляют контроль формы, целостности, насыщаемости и сорбционную емкость микросфер. Флаконы с лиофилизированными микросферами закатывают колпачками.

После стадии ТП.12 «Радиационная стерилизация» осуществляют контроль по показателям стерильности и пирогенности, после чего дополнительно контролируют целостность, форму, насыщаемость и сорбционную емкость микросфер.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе способа получения полимерных микросфер [10] составлена технологическая схема производства. Проведен анализ критических контрольных точек стадий основного процесса производства микросфер.

Показано, что стадии основного технологического процесса содержат семь контрольных критических точек. Среди них необратимыми являются стадии: ТП.4 «Полимеризация»; ТП.10 «Лиофилизация» и ТП.12 «Радиационная стерилизация». В случае несоответствия контролируемых параметров техническим требованиям на данных стадиях полупродукт отбраковывается.

Данные исследования в дальнейшем могут быть использованы для валидации и масштабирования технологического процесса.

## ЛИТЕРАТУРА

- Nouri Y. M., Kim J. H., Yoon H. K., Ko H. K., Shin J. H., Gwon D. I. Update on Transarterial Chemoembolization with Drug-Eluting Microspheres for Hepatocellular Carcinoma. *Korean J Radiol.* 2019;20(1):34–49. Doi: 10.3348/kjr.2018.0088.
- Яковлев В. Н., Араблинский А. В., Хайрутдинов Е. Р., Цуркан В. А., Фомин В. Н., Алексеев В. Г. Возможности эндоваскулярной эмболизации, химиоэмболизации и химиоиммуноэмболизации в условиях многопрофильной больницы. *Клиническая медицина.* 2012;12:65–69.
- Гительзон Д. Г., Рогов Д. А., Васильев А. Э., Гительзон Е. А. Основы химиоэмболизации (обзор литературы). *Вестник РУДН. Серия: медицина.* 2017;21(2):194–204. Doi: 10.22363/2313-0245-2017-21-2-194-204.
- Серегин А. А. Рентгеноэндоваскулярная химиоэмболизация печеночной артерии – современный метод регионарной химиотерапии злокачественных поражений печени. *Современные технологии в медицине.* 2014;6(2):110–126.
- Долгушин Д. И. Интервенционная радиология в онкологии: история развития и современное состояние проблемы. *Практическая онкология.* 2015;16(4):119–130.
- Попов М. В., Аронов М. С., Восканян С. Э., Карпова О. В. Методика трансартериальной химиоэмболизации при первичных и метастатических опухолях печени. *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2016;12(4):716–720.
- Плечев В. В., Муфазалов Ф. Ф., Шестаков А. И., Ишметов В. Ш., Логинов М. О., Утенская И. Д. Эффективность лечения гепатоцеллюлярного рака и метастазов рака других локализаций в печень методом химиоэмболизации. *Медицинский вестник Башкортостана.* 2012;7(1):80–83.
- Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения. Available at: <https://www.roszdravnadzor.ru/services/misearch> (дата обращения 09.03.2020).
- Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Available at: <https://www.who.int/medicines/publications/pharmprep/ru> (дата обращения 10.06.2020).
- Дунаев А. А., Блинов О. В. Способ получения полимерных микросфер для эмболизации и химиоэмболизации. Патент РФ RU 2646832. 07.03.18.
- Seregin A. A. Radioendovascular Chemoembolization of Hepatic Artery is an Advanced Technique of Regional Chemotherapy in Malignant Hepatic Tumors. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine.* 2014;6(2):110–126. (In Russ.).
- Dolgushin B. I. Interventional radiology in oncology: the history of development and modern state of the problem. *Prakticheskaya onkologiya = Practical oncology.* 2015;16(4):119–130. (In Russ.).
- Popov M. V., Aronov M. S., Voskanyan S. E., Karpova O. V. Transarterial chemoembolization for primary and metastatic liver tumors (review). *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research.* 2016;12(4):716–720. (In Russ.).
- Plechev V. V., Mufazalov F. F., Shestakov A. I., Ishmetov V. Sh., Loginov M. O., Utenskaya I. D. Efficacy of treatment by chemoembolization in hepatocellular carcinoma and distant metastases into the liver. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal.* 2012;7(1):80–83. (In Russ.).
- Federal Service for Surveillance in Healthcare. Available at: <https://www.roszdravnadzor.ru/services/misearch> (accessed 09.03.2020). (In Russ.).
- World Health Organization (WHO). Available at: <https://www.who.int/medicines/publications/pharmprep/ru> (accessed 10.06.2020). (In Russ.).
- Dunaev A. A., Blinov O. V. Sposob polucheniya polimernykh mikrosfer dlya embolizatsii i khimioembolizatsii. Russian Federation patent RU 2646832. 2018 March 07. (In Russ.).

## REFERENCES

- Nouri Y. M., Kim J. H., Yoon H. K., Ko H. K., Shin J. H., Gwon D. I. Update on Transarterial Chemoembolization with Drug-Eluting Microspheres for Hepatocellular Carcinoma. *Korean J Radiol.* 2019;20(1):34–49. Doi: 10.3348/kjr.2018.0088.
- Yakovlev V. N., Arablinsky A. V., Khairutdinov E. R., Tsurkan V. A., Fomin V. N., Alekseev V. G. Potential of endovascular embolization, chemoembolization and chemoimmunoembolization based at a multidisciplinary hospital. *Klinicheskaya meditsina = Clinical medicine.* 2012;12:65–69. (In Russ.).
- Gitelson D.G., Rogov D.A., Vasiliev A.E., Gitelson E.A. Basics of chemoembolization (literature review). *Vestnik RUDN. Seriya: meditsina = RUDN Journal of Medicine.* 2017;21(2):194–204. (In Russ.). Doi: 10.22363/2313-0245-2017-21-2-194-204.