

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

- REZUMAT -

ROLUL MARKERILOR IMUNOLOGICI ÎN EVALUAREA AFECTĂRII RENALE LA PACIENȚII CU CIROZĂ HEPATICĂ

Conducător științific:

Prof.univ.dr. ION ROGOVEANU

Student - doctorand:

FIRU ȘTEFAN GEORGE

CRAIOVA

2018

INTRODUCERE

Boala hepatică cronică și stadiul final al acesteia, ciroza hepatică, ocupă un loc important între cauzele de deces la nivel mondial. Disfuncția renală reprezintă una dintre complicațiile frecvent întâlnite la pacienții cu ciroză hepatică, cu prognostic nefavorabil pe termen scurt. Între cauzele disfuncției renale la pacienții cu ciroză, sindromul hepato-renal (SHR) are loc aparte fiind o formă specială de afectare renală. Diagnosticul SHR este în principal unul de excludere, existând de-a lungul anilor numeroase tentative de stabilire a unor criterii de identificare a pacienților afectați. Injuria renală acută (IRA) este o urgență în nefrologie, prognosticul depinzând de stabilirea cât mai precoce a diagnosticului și intervenția terapeutică cât mai rapidă. Markerii clasici ai disfuncției renale identifică tardiv reducerea funcției renale și au dezavantajul că nu pot identifica factorul etiologic ce stă la baza afectării renale. Din acest motiv, tot mai multe cercetări s-au orientat spre descoperirea unor biomarkeri ai IRA asemănător troponinei folosită în cardiologie. Acestea au condus la descoperirea unor molecule cu rezultate promițătoare în situații clinice bine definite, în care tipul și momentul injuriei renale sunt cunoscute, dar realitatea din practica clinică este mult mai complexă, astfel că studiile de validare a acestor biomarkeri au diminuat entuziasmul specialiștilor din domeniu și trebuie continuate.

Obiectivul general al acestei cercetări este evaluarea rolului unor markeri imunologici ai afectării renale la pacienții cu ciroză hepatică, utilitatea acestor markeri în stabilirea diagnosticului și a prognosticului la această categorie specială de pacienți.

CUVINTE CHEIE: ciroză hepatică, injurie renală acută, cistatină C, NGAL, IL-18.

STADIUL CUNOAȘTERII

În partea generală a tezei sunt prezentate conceptele actuale referitoare la ciroza hepatică și sindromul hepatorenal, problemele de diagnostic al disfuncției renale la pacienții cu ciroză hepatică și date despre potențialii biomarkeri care ar putea facilita diagnosticul precoce al injuriei renale acute dând posibilitatea unei intervenții terapeutice de succes pentru pacienții afectați.

1. Ciroza hepatică

Ciroza hepatică reprezintă stadiul final, ireversibil, al tuturor bolilor hepatice și este determinată de o multitudine de factori de injurie care acționează la nivelul ficatului. [Balabaud C, Bioulac-Sage, 2010]. Actual, pot fi identificate patru cauze majore responsabile de apariția cirozei hepatice: boala hepatică alcoolică, hepatita cronică virală C, hepatita cronică virală B și boala ficatului gras non-alcoolic. Conform raportărilor OMS, în România, ciroza hepatică ocupă locul al patrulea într-un clasament al cauzelor de deces, fiindu-i atribuite aproximativ 11.000 de decese în anul 2012.[Country statistics and global health estimates by WHO and UN partners]

Evoluția unei afectări hepatice cronice către ciroză implică declanșarea mai multor procese printre care necro-inflamația, fibrogeneza, angiogeneza și necroza parenchimului secundară ocluziilor vasculare, regenerarea nodulară. Depunerea de țesut fibros depinde de locul injuriei hepatice, dar rezultatul final este modificarea cantitativă și calitativă a matricei extracelulare (MEC). Studiile efectuate au atribuit celulelor hepatice stelate rolul principal în depunerea MEC în exces, însă ultimele cercetări evidențiază surse secundare de fibroză, determinate de implicarea altor celule rezidente ale țesutului hepatic sau provenite din circulația generală.[Wells, 2008] Rezultatele unui studiu anterior [Tache et al., 2015] susțin originea multiplă a miofibroblastelor implicate în remodelarea MEC, acestea putând proveni din mai multe tipuri de celule hepatice adulte (hepatocite, colangiocite, fibroblaste portale) în urma unui proces de tranziție epitelio-mezenchimală.

În cele mai multe cazuri, diagnosticul cirozei hepatice se bazează pe o anamneză detaliată și un examen clinic atent, coroborate cu investigații de laborator variate și tehnici imagistice. Biopsia hepatică reprezintă metoda „gold standard” în stabilirea diagnosticului la pacienții cu afectare hepatică [Afdhal și Nunes, 2004], dar utilizarea acestui procedeu a scăzut progresiv odată cu dezvoltarea unor noi metode non-invazive de evaluare a fibrozei hepatice (Fibroscan, Fibromax). [Foucher et al., 2006, Morra et al., 2007] Rezultatele unui studiu anterior au indicat rezultate similare ale elastografiei tranzitorii și elastografiei în timp real în evaluarea fibrozei la pacienții cu hepatopatii cronice. [Jieanu et al., 2015] Utilizarea Fibromax pentru evaluarea fibrozei hepatice este susținută de rezultate favorabile obținute în studii efectuate recent, testul dovedindu-se o alternativă optimă pentru biopsia hepatică.[Poynard et al., 2005, Ratziu et al., 2006]

2. Afectarea renală în ciroza hepatică

Importanța afectării renale pentru prognosticul pacienților cu ciroză hepatică a fost recunoscută odată cu introducerea scorului MELD pentru evaluarea mortalității pe termen scurt a acestor pacienți. Pacienții cu ciroză hepatică prezintă o serie de particularități care fac ca diagnosticul diferențial al disfuncției renale să reprezinte o importantă problemă pentru clinicieni. Noile strategii terapeutice au îmbunătățit supraviețuirea pacienților cu ciroză hepatică și complicații renale, dar o identificare precoce și exactă a afectării renale ar putea spori și mai mult eficiența acestora. Lipsa unor criterii de diagnostic universal acceptate la nivel mondial a făcut dificilă efectuarea unor studii epidemiologice precise pentru determinarea prevalenței și incidenței afectării renale la pacienții cu ciroză hepatică. Datele dintr-o serie de cercetări au raportat o prevalență importantă a disfuncției renale acute de aproximativ 19-20% la pacienții spitalizați cu ciroză hepatică. [Garcia-Tsao et al., 2008]

Principalele trei cauze ale IRA observate la pacienții cu ciroză hepatică sunt: azotemia prerenală (~45% din cazuri), SHR (~23% din cazuri) și necroza tubulară acută (~32% din cazuri). [Garcia-Tsao et al., 2008]

Diagnosticul pozitiv și clasificarea etiologică a disfuncției renale se bazează în prezent pe identificarea unor modificări ale unor markeri endogeni convenționali, cum ar fi concentrația serică a creatininei și ureei, informații suplimentare fiind oferite de examenul de urină. Rata filtrării glomerulare este cel mai important indicator al funcției excretorii renale, ocupând rolul central în evaluarea funcționalității rinichilor. Criteriile de diagnostic al disfuncției renale la pacienții cu ciroză hepatică au fost supuse mai multor modificări de-a lungul anilor. Grupul de lucru ADQI-IAC a propus utilizarea termenului de „afectare hepato-renală” pentru descrierea oricărei disfuncții renale identificată la pacientul cu ciroză hepatică care îndeplinește criteriile pentru IRA, BCR sau SHR. [Piano et al., 2013]. SHR este definit ca insuficiența renală ce apare la pacienții cu boală hepatică cronică avansată, sau uneori hepatită fulminantă, în absența altor cauze identificabile ale disfuncției renale. Mult timp această afecțiune a fost considerată ireversibilă, singurul tratament acceptat fiind transplantul renal. Studiile ultimului deceniu au permis o mai bună înțelegere a fiziopatologiei SHR și au oferit noi perspective în legătură cu tratamentul farmacologic.

Explorările paraclinice prezente la pacienții cu SHR indică următoarele anomalii: creșterea ureei și creatininei serice, scăderea osmolalității plasmatică și creșterea celei urinare, scăderea natriuriei, creșterea activității reninei plasmatică, creșterea activității noradrenalinei plasmatică, hiponatremie, hiperkalemie. [Wong et al., 1995] La acești pacienți întâlnim și indicatori paraclinici ai afectării hepatice: hipoalbuminemie, hiperbilirubinemie, timp de protrombină prelungit, etc.. Cu toate că descoperirea unor biomarkeri specifici SHR a prezentat un interes deosebit pentru cercetare, cercetările nu au permis identificarea lor până în prezent.

3. Biomarkeri ai afectării renale

Asemănător infarctului miocardic acut, IRA reprezintă o situație acută, cu un prognostic sumbru, ce necesită identificare și intervenție terapeutică cât mai precoce. Așadar, cercetările din domeniul nefrologiei au prezentat un interes deosebit pentru identificarea unor biomarkeri renali ai IRA, ultimul deceniu aducând în prim plan o serie de molecule, între care: Cistatina C (marker endogen al filtrării glomerulare [Nejat et al., 2010, Inker et al. 2012, De Souza et al., 2014]), Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin - NGAL (biomarker pentru diagnosticul pozitiv și diferențial al IRA [Osterman et al., 2012, Haase et al., 2014, Firu et al., 2015]), Interleukina 18-IL-18 (citokină proinflamatoare produsă de celulele tubilor proximali în diverse afectări renale [Parikh et al., 2006, Edelstein et al., 2007]). De la descoperirea biomarkerilor, o serie de studii clinice au evaluat utilitatea lor în identificarea precoce a IRA și determinarea evoluției acesteia, cât și în diagnosticul diferențial al tipurilor de disfuncție renală, în diverse scenarii clinice, la populația adultă sau pediatrică. [Osterman et al., 2012]

CONTRIBUȚII PERSONALE

4. Ipoteza de lucru și obiective

Obiectivul general al cercetărilor din această teză a vizat evaluarea unor noi metode de diagnostic și evaluare a afectării renale la pacienții cu ciroză hepatică în practica clinică, propunându-se următoarele **obiective specifice**:

- Evaluarea utilității aplicării în practica clinică a noilor definiții și criterii de diagnostic al afectării funcției renale la pacienții cu ciroză hepatică;
- Rolurile unor noi biomarkeri pentru diagnosticarea precoce a disfuncției renale la pacienții cu ciroză hepatică.

5. Metodologie generală

Cercetările desfășurate au fost încadrate în următoarele studii clinice:

Studiul 1. Evaluarea parametrilor clinici și paraclinici asociați cu dezvoltarea injuriei renale acute la pacienții cu ciroză hepatică;

Studiul 2. Rolul cistatinei C serice în evaluarea funcției renale la pacienții cu ciroză hepatică;

Studiul 3. Rolul unor noi biomarkeri ai afectării renale (NGAL, IL-18) în diagnosticul pozitiv și diferențial al IRA la pacienții cu ciroză hepatică.

Am efectuat un studiu observațional prospectiv, avizat de Comisia de Etică și Deontologie Universitară și Științifică de la UMF din Craiova în care au fost incluși pacienți cu ciroză hepatică cu și fără disfuncție renală, internați în Clinica de Gastroenterologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență din Craiova.

S-au recoltat probe biologice pentru determinarea unor parametri biochimici și hematologici pentru evaluarea funcțiilor hepatică și renală, realizate cu un analizor automat de biochimie Abbott Architect pe baza unor metode standardizate. Dozarea markerilor imunologici a fost realizată în cadrul Laboratorului de Biochimie al UMF Craiova. Determinarea NGAL, a cistatinei C și interleukinei 18 a fost realizată prin metode bazate pe tehnica ELISA utilizând o linie completă StatFax (Awareness Technology Inc). Pentru analiza statistică a datelor am folosit programul Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA), împreună cu add-on-ul XLSTAT 2014 pentru MS Excel (Addinsoft SARL, Paris, Franța) și programul IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Datele obținute au fost înregistrate în fișiere Microsoft Excel, apoi au fost prelucrate statistic în vederea analizării relațiilor dintre datele clinice și paraclinice.

6. Studiul 1. Evaluarea parametrilor clinici și paraclinici asociați cu dezvoltarea injuriei renale la pacienții cu ciroză hepatică

Obiectivele acestui studiu au fost: identificarea factorilor asociați cu dezvoltarea IRA la pacienții cu ciroză hepatică; evaluarea noilor criterii de diagnostic al IRA vs criteriul tradițional; identificarea factorilor declanșatori ai SHR la lotul studiat.

Din lotul total de pacienți (n=55), utilizând criteriul tradițional de diagnostic (creatinină serică >1,5mg/dL) au fost identificați 20 de pacienți cu IRA (36,4% din cazuri), în timp ce prin

aplicarea criteriului de diagnostic din clasificarea *AKIN*, au fost identificați 22 de pacienți cu IRA (41% din cazuri). Ceilalți 33 pacienți au constituit lotul cu ciroză hepatică fără IRA.

În cadrul lotului de pacienți cu IRA, 10 au îndeplinit criteriile *AKIN* pentru diagnosticul IRA la momentul internării, restul dezvoltând această complicație pe parcursul spitalizării.

Datele epidemiologice obținute din acest studiu indică o prevalență mai ridicată a cirozei hepatice la cei care provin din mediul rural (62%), sexul masculin fiind mai frecvent afectat (59%), în special la cei cu vârste cuprinse între 50 și 59 ani ($n=20$), în timp ce consumul de alcool etilic a fost identificat ca factor etiologic predominant al afectării hepatice ($n=36$).

S-au observat diferențe semnificative statistic între pacienții cirofici cu IRA și fără IRA în ceea ce privește hemoglobina, hematocritul, numărul de leucocite, timpul de protrombină și albuminemie. Prezența ascitei, encefalopatiei și a hiponatremiei a fost mai frecvent identificată la pacienții cu IRA. Factorul declanșator ce a contribuit predominant la dezvoltarea SHR a fost paracenteza, urmată de peritonita bacteriană spontană și hemoragia digestivă superioară.

7. Studiul 2. Rolul cistatinei C serice în evaluarea funcției renale la pacienții cu ciroză hepatică

Obiectivele studiului au fost: evaluarea rolului cistatinei C ca marker precoce de predicție al dezvoltării IRA la pacienții cu ciroză hepatică; compararea ratei filtrării glomerulare utilizând formule de calcul bazate pe creatinina serică și/sau cistatina serică.

Pacienții au fost împărțiți în două loturi în funcție de valoarea creatininei serice la momentul recoltării probelor biologice, utilizând valorile prag 1,1 mg/dL pentru sexul feminin și 1,2 mg/dL pentru sexul masculin, astfel:

- Lotul 1 – 36 subiecți cu o valori normale ale creatininei serice;
- Lotul 2 - 19 pacienți cu valori crescute ale creatininei serice.

Ecuțiile bazate pe CrS (MDRD și $CKD-EPI_{CrS}$) au identificat 19 pacienți cu eRFG sub 60 ml/min/1,73m² (34,5% din lotul total). Formula $CKD-EPI_{mixt}$, care utilizează CrS și Cis C, a evidențiat 22 pacienți (40% din lotul total) cu eRFG mai mic de 60 ml/min/1,73m², iar cu ecuația bazată pe cistatina C ($CKD-EPI_{CisC}$) am observat eRFG sub valoarea prag la 32 de subiecți (58,2% din lotul total).

Conform rezultatelor studiului efectuat, pacienții cu ciroză hepatică și o valoare normală a CrS prezintă un risc crescut de a dezvolta IRA dacă se decelează valori serice ale cistatinei C peste valoarea prag de 1,27 mg/L. Acest prag identifică pacienții cu risc pentru apariția IRA cu o sensibilitate și o specificitate de 75.00%, respectiv 96.43%. Pentru o monitorizare mai atentă a pacienților cu ciroză hepatică și funcție renală normală, din curba ROC am determinat valoarea de 1,1 mg/L ca prag pentru identificarea pacienților cu CrS normală, dar care prezintă riscul de a dezvolta IRA, cu o sensibilitate și o specificitate de 100%, respectiv 71.43%

8. Studiul 3. Rolul unor noi markeri ai afectării renale (NGAL, IL-18, albuminurie) în diagnosticul pozitiv și diferențial al injuriei renale acute la pacienții cu ciroză hepatică

Principalul obiectiv al acestui studiu a fost reprezentat de evaluarea rolului noilor biomarkeri renali la pacienții cu ciroză hepatică și afectare renală.

NGAL și IL-18 în diagnosticul pozitiv al IRA la pacienții cu ciroză hepatică

Pentru evaluarea utilității markerilor în diagnosticul pozitiv al IRA la pacienții cu ciroză hepatică, s-au constituit 2 loturi:

- Lot I – 33 pacienți cu ciroză hepatică fără injurie renală acută;
- Lotul II – 19 pacienți cu ciroză hepatică și injurie renală acută.

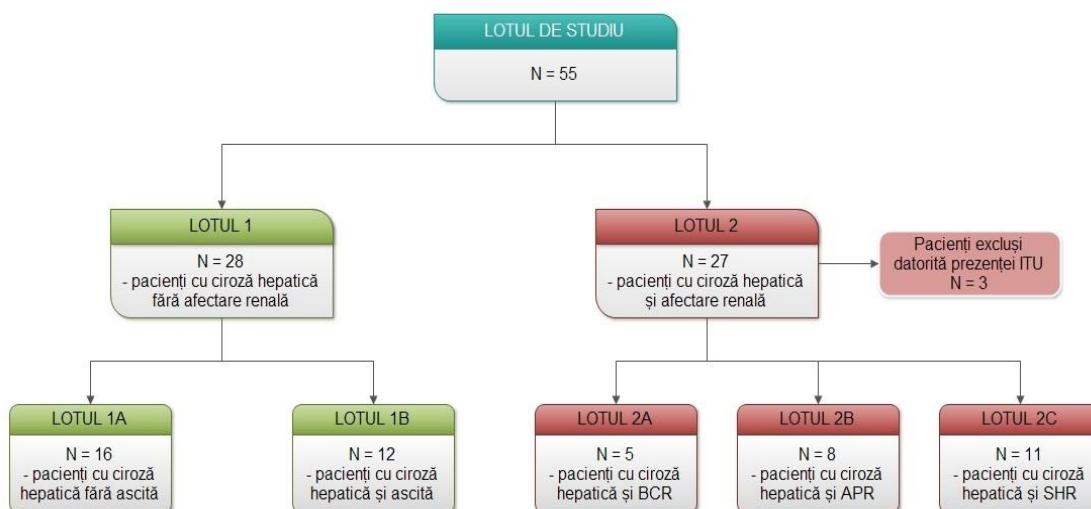
Testul t Student a evidențiat diferențe înalt semnificative pentru nivelurile NGAL serică și urinară, IL-18 urinară între cele două loturi.

Analiza statistică a permis extragerea valorilor recomandate ca prag pentru markerii studiați: 20 ng/mL pentru NGAL urinară, 125 ng/mL pentru NGAL serică și 20 pg/mL pentru IL-18 urinară.

S-a încercat stabilirea unei metode mai bune de detectare a pacienților cu IRA, prin folosirea combinată a markerilor anteriori, propunând ecuația model:

$$\text{Probabilitate IRA} = 1 / (1 + \exp(-(-3.12974 + 0.17446 * \text{NGAL urinară} - 0.02508 * \text{IL-18 urinară})))$$

Pentru evaluarea utilității markerilor în diagnosticul diferențial al disfuncției renale la pacienții cu ciroză hepatică, numărul total de subiecți incluși în studiu (n=55) a fost repartizat în loturi și sub-loturi conform algoritmului de mai jos:



Testul ANOVA a evidențiat diferențe semnificative între cele 5 loturi de pacienți pentru toți markerii determinați, testul "post hoc" Fisher LSD arătând că valorile pentru lotul 2C diferă net de cele pentru celelalte patru loturi.

Pentru a evalua rolul markerilor studiați în prognosticul pacienților cu ciroză hepatică am verificat corelația dintre aceștia și valorile scorului MELD, utilizat la scară largă pentru

predicția mortalității pe termen scurt. Toate corelațiile sunt înalt semnificative ($p < 0.001$), cu excepția corelației dintre scorul MELD și nivelul IL-18 urinară.

8. Concluzii

- Utilizarea noilor criterii de diagnostic al IRA ar putea conduce la o identificare mai eficientă a pacienților cu ciroză hepatică care dezvoltă această complicație;
- Dezvoltarea IRA la pacienții cu ciroză hepatică se asociază cu grad avansat al bolii;
- La pacienții cu ciroză hepatică și creatininemie normală, formulele bazate pe cistatina C evidențiază o eRFG redusă în raport cu cea calculată pe baza creatininei serice, ceea ce ar justifica riscul crescut al acestor pacienți de a dezvolta IRA
- Dozarea cistatinei C serice ar putea fi utilă în predicția riscului dezvoltării IRA la pacienții cu ciroză hepatică, rezultatele acestui studiu evidențiind două valori prag ce pot identifica pacienții aflați la risc, cu grade diferite de sensibilitate și specificitate;
- Noii biomarkeri renali (NGAL, IL-18) sunt utili în diagnosticul pozitiv al IRA la pacienții cu ciroză hepatică, dar prezența unor infecții bacteriene ar putea reprezenta factori de interferență în determinarea acestora.
- Nivelurile mai ridicate ale NGAL serică la pacienții cu sindrom hepatorenal ar putea fi explicate de implicarea unor mecanisme secundare în patogenia acestei afecțiuni;
- Valorile NGAL în urină și ser ar putea fi utilizate ca indicatori ai prognosticului la pacienții cu ciroză hepatică, acestea fiind corelate cu scorul MELD, dar cercetări suplimentare sunt necesare pentru confirmarea acestei ipoteze;
- Acesta este primul studiu realizat în România care își propune să analizeze rolul biomarkerilor menționați anterior în evaluarea afectării renale a pacienților cu ciroză hepatică.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:1160–1174.

Balabaud C, Bioulac-Sage P. Cirrhosis: what else? *Gastroenterol Clin Biol*. 2010; 34(4-5):252-254.

Country statistics and global health estimates by WHO and UN partners. For more information visit the Global Health Observatory (http://who.int/gho/mortality_burden_disease/en/) Last updated: January 2015

De Souza V, Hadj-Aissa A, Dolomanova O et al. Creatinine- versus cystatin C-based equations in assessing the renal function of candidates for liver transplantation with cirrhosis. *Hepatology*. 2014;59:1522-1531.

Edelstein CL, Hoke TS, Somerset H et al. Proximal tubules from caspase-1-deficient mice are protected against hypoxia-induced membrane injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22:1052.

Firu SG, Streba CT, Firu D et al. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) – a biomarker of renal dysfunction in patients with liver cirrhosis: Do we have enough proof? *J Med Life*. 2015; 8(Spec Issue):15-20.

Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut*. 2006;55(3):403-408.

Garcia-Tsao G, Parikh CR, Viola A. Acute kidney injury in cirrhosis. *Hepatology*. 2008 ; 48(6):2064-2077.

Haase M, Haase-Fielitz A, Bellomo R et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute renal disease. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(1):11-18.

Inker LA, Schmid CH, Tighiouart H et al. Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. *New Engl J Med*. 2012, 367(1): 20-29.

Jieanu C, Ungureanu B, Sandulescu DL et al. Real time elastography assessment of fibrosis in chronic viral hepatitis. *Curr Health Sci J*. 2015;41(4):317-324.

Morra R, Munteanu M, Imbert-Bismut F et al. FibroMax: Towards a new universal marker of hepatic disease? *Expert Rev Mol Diagn*. 2007 ;7(5):481-490.

Nejat M, Pickering JW, Walker RJ et al. Rapid detection of acute kidney injury by plasma cystatin C in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25(10): 3283-3289.

Ostermann M, Philips BJ, Forni LG. Clinical review: biomarkers of acute kidney injury: where are we now. *Crit Care*. 2012;16(5):233.

Parikh CR, Jani A, Mishra J et al. Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6:1639-1645.

Piano S, Rosi S, Maresio G et al. Evaluation of the Acute Kidney Injury Network criteria in hospitalized patients with cirrhosis and ascites. *J Hepatol*. 2013;59(3):482-489.

Poynard T, Ratziu V, Naveau S et al. The Diagnostic Value of Biomarkers (SteatoTest) for the Prediction of Liver Steatosis. *Comp Hepatol*. 2005 ;23(4):10

Ratziu V, Massard J, Charlotte F et al. Diagnostic Value of Biochemical Markers (FibroTest-FibroSURE) for the Prediction of Liver Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:6.

Tache DE, Firu S, Andrei AM et al. Correlation between TGF- β 1 and FSP-1 Expression in Chronic Viral Hepatitis-an Immunohistochemical Study. *Curr Health Sci J*. 2015;41(2):179-185.

Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:1160–1174.

Wells RG. Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis*. 2008;12(4):759-768.

Wong F, Sniderman K, Liu P et al. The effects of transjugular intrahepatic portasystemic shunt on systemic and renal hemodynamics and sodium homeostasis in cirrhotic patients with refractory ascites. *Ann Intern Med*. 1995; 122:816-822.