

Определение изменения видового состава вирулентной микрофлоры при язвенном пульпите на этапах эндодонтического лечения

В.Н. ЦАРЕВ, д.м.н., проф., зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии
 А. В. МИТРОНИН, д.м.н., проф., зав. кафедрой терапевтической стоматологии и эндодонтии ФПДО
 Д.А. ЧЕРДЖИЕВА, врач-стоматолог
 ГОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет Росздрава»

Definition of change of specific structure of virulent microflora at an ulcer pulpitis at the stages of endodontic treatment

V.N. TSAREV, A.V. MITRONIN, D.A. CHERDZHIEVA



В.Н. ЦАРЕВ



А. В. МИТРОНИН



Д.А. ЧЕРДЖИЕВА

Резюме

Проведен анализ микробной флоры корневых каналов при хроническом язвенном пульпите, на этапах эндодонтического лечения. Изучена антибактериальная и противовоспалительная эффективность препаратов при эндодонтической обработке системы корневых каналов. Результаты клинических исследований 83 пациентов показали, что при анализе микробной флоры в содержимом корневых каналов у пациентов с язвенным пульпитом выявлены ассоциации от двух до девяти видов бактерий, которые относились преимущественно к микроаэрофильным или облигатно-анаэробным видам. Установлены изменения видового состава вирулентной микрофлоры на этапах эндодонтического лечения. С применением гидроокиси кальция эффективность антибактериальной деконтаминации системы каналов корней возрастает в два раза, а с применением гидроокиси меди-кальция – в четыре раза.

Ключевые слова: язвенный пульпит, гидроокись меди-кальция, эндодонтическое лечение, вирулентная микрофлора.

Abstract

The analysis of the microbial flora of root canals with chronic ulcerative pulpitis at the stage of endodontic treatment was carried out. Antibacterial and anti-inflammatory efficacy in the preparations at endodontic treatment of root canals was studied. Clinical studies of 83 patients showed that the analysis of microbial flora in the content of root canals in patients with ulcerative pulpitis allowed identifying associations of two to nine species of bacteria, which mainly referred to microaerophilic or obligate-anaerobic species. Variations of species composition of virulent microflora at the stages of endodontic treatment were established. With the use of calcium hydroxide decontamination efficacy of antibacterial root canal system increases twice, while with the use of copper-calcium hydroxide it increases four times.

Key words: ulcerative pulpitis, copper-calcium hydroxide, endodontic treatment, virulent microflora.

Введение

Лечение хронических форм пульпита остается одной из актуальных проблем стоматологии [1, 2]. Как известно, причиной возникновения некроза пульпы и его распространенности является бактериальная инвазия [5]. Определено, что после некроза пульпы происходит микробная контаминация апикального периодонта, рост и развитие анаэробной бактериальной флоры в системе корневых каналов, способной вызвать деструктивные изменения в условиях сообщения среды корневого канала и полости рта [6, 7].

На сегодняшний день благодаря развитию новых технологий и совершенствованию методов анаэробного культивирования, становится возможным провести точную микробиологическую диагностику. Она позволяет определить состав микробной флоры на различных этапах эндодонтического лечения в зубах с некрозом пульпы, а также после применения различных антибактериальных средств, в результате чего помогает подобрать наиболее подходящий препарат для лечения заболевания и определять новые возможности в профилактике рецидивов воспаления после эндодонтического лечения [3, 4].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести анализ микробной флоры системы корневых каналов при хроническом язвенном пульпите на этапах эндодонтического лечения и оценить антибактериальную эффективность препаратов (3% NaOCL, гидроокиси кальция, гидроокиси меди-кальция, входящие в систему «Купролент»).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для определения и выявления вирулентных бактерий, заселяющих корневые каналы, проводили микробиологические исследования у 83 пациентов (в возрасте от 18 до 65 лет), в том числе у 58 женщин и 25 мужчин с хроническим язвенным пульпитом. Микробиологическое исследование заключалось в проведении метода культурального (бактериологического) исследования.

Методика забора материала проводилась по следующей схеме: коронку зуба очищали от

зубного налета гигиенической полировочной щеткой с последующей обработкой 3% раствором перекиси водорода. После препарирования кариозной полости, раскрытия полости зуба, обеспечения эндодонтического доступа в канале проводили забор материала с помощью стерильного бумажного эндодонтического штифта. Образцы полученных проб помещали для аэробного и анаэробного исследования в соответствующие транспортные системы и доставляли их в бактериологическую лабораторию.

Больные были разделены на три группы: I – контрольная группа, 27 больных (28 зубов) с применением 3% раствора NaOCL; II – группа сравнения, 27 больных (27 зубов) с применением гидроокиси кальция; III – основная группа, 29 больных (29 зубов) с применением гидроокиси меди-кальция.

Во II и III группах забор материала брали три раза, сразу после раскрытия полости зуба. Далее после механической и медикаментозной обработки 3% гипохлоритом натрия и после временного пломбирования корневых каналов препаратом гидроокиси меди-кальция, оставленного на 14 дней, в I группе забор материала брали два раза: сразу после раскрытия полости зуба и после механической и медикаментозной обработки корневых каналов 3% раствором гипохлорита натрия. Далее корневые каналы пломбировались гуттаперчевыми штифтами с использованием силикера AH plus.

Культуральное исследование включало количественный культуральный посев на питательные среды, предназначенные для культивирования бактерий полости рта в аэробных и анаэробных условиях. Результаты количественного исследования выражались через десятичный логарифм колониобразующих единиц – Ig KOE/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У 27 пациентов (28 зубов) контрольной группы проводили сравнительный анализ микробной обсемененности системы корневых каналов с использованием техники анаэробного культивирования.

При вскрытии пульпарной полости ни в одном случае ее со-

держимое не было стерильным. Всего выявлены представители 15 родов в ассоциациях по 3-9 представителей (табл. 1).

Наиболее высокой у значительного количества пациентов была обсемененность микроАэрофильными стрептококками с альфа- и бета-гемолитической активностью: *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*. Максимальной была частота выявления *Streptococcus sanguis* – представителей этого вида обнаруживали в 16 зубах из 28, что составляло 57,1%. *Streptococcus intermedius* определяли у 1/4, а *Streptococcus mitis* – у 1/5 пациентов. Представители *Streptococcus mutans* обнаружены в корневых каналах зуба лишь у двух пациентов, что составило 7,1%. Представители облигатно-анаэробного рода *Peptostreptococcus* spp. выделены примерно у 1/3 пациентов, а факультативно-анаэробного рода *Enterococcus* spp. – у 1/4.

Также примерно у 1/5 пациентов определяли представителей грамположительных палочек – актиномицетов, и существенно реже – коринебактерий и эубактерий (10,1%) и (7,1%) соответственно.

Представители грамотрицательной облигатно-анаэробной флоры по частоте обнаружения разных видов варьировали от *Prevotella nigrescens* (32,1%) до *Porphyromonas gingivalis* (7,1%). Примерно у 1/3 пациентов определялись представители пародонтопатогенных видов *Tannerella forsythia* и *Fusobacterium* spp., что было несколько выше, чем в другой группе.

В двух зубах из 28 выделяли дрожжеподобные грибы рода *Candida*, что составило (7,1%).

После обработки 3% раствором гипохлорита натрия в корневых каналах наблюдали существенные сокращение микробной обсемененности, как по разнообразию выделяемых видов, так и по количественному параметру. В трех зубах из 28 с язвенным пульпитом после обработки 3% NaOCl не выделено ни одного вида микробов, что составило 11,1%.

Наиболее высокий уровень контаминации отмечали для различных стрептококков и энтерококков, в частности *Streptococcus sanguis*, *Peptostreptococcus* spp.

Таблица 1. Частота выделения микробной флоры из корневых каналов на этапе эндодонтического лечения с применением для обработки 3% раствора гипохлорита натрия (n = 28)

Вид микробы	До лечения		Обработка 3% NaOCL	
	Число выделенных штаммов	Частота, %	Число выделенных штаммов	Частота, %
1. <i>Streptococcus sanguis</i>	16	57,1	4	14,3
2. <i>Streptococcus intermedius</i>	7	25,0	3	10,7
3. <i>Streptococcus mitis</i>	6	21,4	1	3,6
4. <i>Streptococcus mutans</i>	2	7,1	—	—
5. <i>Peptostreptococcus</i> spp.	9	32,1	4	14,3
6. <i>Enterococcus</i> spp.	7	25,0	3*	10,7
7. <i>Actinomyces</i> spp.	6	21,4	2	7,1
8. <i>Corynebacterium</i> spp.	3	10,7	1	3,6
9. <i>Eubacterium</i> spp.	2	7,1	—	—
10. <i>Prevotella nigrescens</i>	9	32,1	4*	14,3
11. <i>Tannerella forsythia</i>	8	28,6	3	10,7
12. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	2	7,1	1	3,6
13. <i>Fusobacterium</i> spp.	8	28,6	3	11,1
14. <i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	1**	3,6
15. <i>Candida</i> spp.	2	7,1	—	—
16. «Стерильные» зубы	—	—	3	11,1

*часть штаммов впервые выявлена на этапах эндодонтического лечения

**все штаммы впервые выявлены на этапах эндодонтического лечения

(14,3%), *Streptococcus intermedius* (10,7%) зубов. Из одного зуба выделен *Streptococcus mitis* (3,6%).

В три раза сократилась частота выделения *Actinomyces odontolyticus*, которая после обработки NaOCl составила (7,1%). В одном зубе после обработки сохранился штамм коринебактерии. Эубактерии не выделены.

Довольно устойчивыми были облигатно-анаэробные бактерии пародонтопатогенной группы. Они сохранились у 10,7-14,3% пациентов. Из них только представители *Porphyromonas gingivalis* обнаружены у одного пациента, а остальные виды – у трех-четырех пациентов.

Представители *Candida* spp. после обработки 3% NaOCL у пациентов данной группы не обнаруживали.

В одном случае выделен *Staphylococcus aureus* впервые, то есть в результате вторичной контаминации. Аналогично впервые после обработки каналов зуба были выделены по одному штам-

му *Enterococcus* spp. и *Prevotella nigrescens*.

При оценке результатов микробной обсемененности отмечено статистически достоверное снижение обсемененности представителями всех видов в 1,5-2 раза, включая пародонтопатогенные. Представители видов *Streptococcus mutans*, *Eubacterium* spp., *Candida* spp. после обработки исчезли полностью.

Следовательно, при вскрытии полости зуба и после обработки каналов 3% NaOCL количество стерильных зубов оказалось весьма незначительным – 11,1%. У 89,9% пациентов выделяли представителей от одного до четырех родов бактерий, включая пародонтопатогенные виды. Это явилось основанием для дополнительной обработки корневых каналов пастами, содержащими антибактериальные компоненты (гидроокись меди-кальция) и отсроченного пломбирования.

У 27 пациентов (27 зубов) группы сравнения с применением в

лечении гидроокиси кальция, при вскрытии пульпарной полости ни в одном случае ее содержимое не было стерильным. Всего выявлены представители 15 родов в ассоциациях по 2-9 представителей.

Высокой у значительного количества пациентов была обсемененность микроаэрофильными стрептококками с альфа- и бета-гемолитической активностью – *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*. Так, *Streptococcus sanguis* обнаруживали в 14 случаях из 27, что составляло 51,8%. *Streptococcus intermedius* и *Streptococcus mitis* определяли у 1/4 пациентов.

Представители облигатно-анаэробного рода *Peptostreptococcus* spp. выделены примерно у 1/3 пациентов, а факультативно-анаэробного рода *Enterococcus* spp. – у семи пациентов, что составило 1/4.

Также примерно у 1/4 пациентов определяли представителей

Таблица 2. Частота выделения микробной флоры из корневых каналов на этапах эндодонтического лечения с применением традиционной пасты, содержащей гидроокись кальция (n = 27)

Вид микробы	До лечения		Обработка 3% NaOCL		После применения гидроокиси кальция	
	Число выделенных штаммов	Частота, %	Число выделенных штаммов	Частота, %	Число выделенных штаммов	Частота, %
1. <i>Streptococcus sanguis</i>	14	51,8	5	18,5	4	14,8
2. <i>Streptococcus intermedius</i>	7	25,9	5	18,5	3	11,1
3. <i>Streptococcus mitis</i>	7	25,9	1	3,7	1	3,7
4. <i>Streptococcus mutans</i>	1	3,7	—	—	—	—
5. <i>Peptostreptococcus</i> spp.	8	29,6	5	18,5	3	11,1
6. <i>Enterococcus</i> spp.	7	25,9	3	11,1	5*	18,5
7. <i>Actinomyces</i> spp.	6	22,2	3	11,1	5*	18,5
8. <i>Corynebacterium</i> spp.	2	7,4	—	—	—	—
9. <i>Eubacterium</i> spp.	2	7,4	—	—	—	—
10. <i>Prevotella nigrescens</i>	10	37,0	5	18,5	2*	6,9
11. <i>Tannerella forsythia</i>	6	22,2	3	11,1	3	10,4
12. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	2	7,4	—	—	1	3,5
13. <i>Fusobacterium</i> spp.	7	25,9	3	11,1	5*	18,5
14. <i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	—	—	—	—
15. <i>Candida</i> spp.	3	11,1	—	—	1*	3,5
16. «Стерильне» зубы	—	—	3	11,1	6	22,2

*часть штаммов впервые выявлена на этапах эндодонтического лечения

**все штаммы впервые выявлены на этапах эндодонтического лечения

граммоположительных палочек – актиномицетов, и существенно реже – коринебактерий (7,4%). Представители эубактерий не выделены ни в одном случае.

Представители грамотрицательной облигатно-анаэробной флоры по частоте обнаружения разных видов варьировали от 37,0% *Prevotella nigrescens* до 7,4% *Porphyromonas gingivalis*.

После обработки 3% NaOCL полости зуба и корневых каналов только у трех пациентов из 27 с язвенным пульпитом не выделено ни одного вида микробов, что составило 11,1%.

После применения традиционной пасты, содержащей гидроокись кальция, только у шести пациентов микрофлора не выявлялась, что составило 22,2% (табл. 2). Из 15 родов микробов, представители которых определялись до начала лечения, выявлены 11.

Частота выделения *Streptococcus sanguis* сократилась

примерно в 3,5 раза от исходной и составила 14,8%, в 2,0-2,5 раза – облигатно-анаэробных видов *Streptococcus intermedius* и *Peptostreptococcus* spp. У одного пациента сохранялось выделение представителей кокков микроаэрофильной группы *Streptococcus mitis*.

Частота выделения представителей грамотрицательной пародонтопатогенной флоры, по сравнению с исходной частотой, сократилась от двух (*Tannerella forsythia*, *Fusobacterium* spp.) до пяти раз (*Prevotella nigrescens*). Частота *Fusobacterium necroforum* уменьшилась менее всего – в 1,5 раза, и они выделены у 18,5% пациентов. Причем у двух пациентов представители вида *Fusobacterium necroforum* и у одного – *Prevotella nigrescens* выявлены впервые, то есть вследствие вторичной контаминации на этапах лечения.

У одного пациента обнаружены грибы *Candida* spp., также впер-

ые на фоне лечения традиционной пастой, содержащей гидроокись кальция.

Следовательно, схема эндодонтического лечения, использованная у пациентов данной группы сравнения, приводит к сокращению показателя выделения вирулентных пародонтопатогенных видов.

У 29 пациентов (29 зубов) основной группы, где применяли гидроокись меди-кальция, также при раскрытии полости зуба содержимое ее не было стерильным. С применением техники анаэробного культивирования определяли от двух до девяти видов бактерий, которые относились исключительно к микроаэрофильным или облигатно-анаэробным видам. Всего выявлены представители 15 родов.

Достаточно высокой и у большинства пациентов была обсемененность микроаэрофильными стрептококками с альфа- и бетагемолитической активностью –

Таблица 3. Частота выделения микробной флоры из корневых каналов на этапах эндодонтического лечения с применением гидроокиси меди-кальция (n = 29)

Вид микробы	До лечения		Обработка 3% NaOCL		После применения гидроокиси меди – кальция	
	Число выделенных штаммов	Частота, %	Число выделенных штаммов	Частота, %	Число выделенных штаммов	Частота, %
1. <i>Streptococcus sanguis</i>	15	51,7	8	27,1	3	10,4
2. <i>Streptococcus intermedius</i>	9	31,0	3	10,4	–	–
3. <i>Streptococcus mitis</i>	7	24,1	–	–	–	–
4. <i>Streptococcus mutans</i>	2	6,9	–	–	–	–
5. <i>Peptostreptococcus</i> spp.	8	27,6	5	17,4	1	3,5
6. <i>Enterococcus</i> spp.	8	27,6	4	13,8	4*	13,8
7. <i>Actinomyces</i> spp.	7	24,1	5	17,4	3*	10,4
8. <i>Corynebacterium</i> spp.	3	10,4	–	–	–	–
9. <i>Eubacterium</i> spp.	2	6,9	1	3,5	–	–
10. <i>Prevotella nigrescens</i>	11	37,9	4	13,8	2*	6,9
11. <i>Tannerella forsythia</i>	8	27,6	3	10,4	3*	10,4
12. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	4	13,8	1	3,5	1	3,5
13. <i>Fusobacterium</i> spp.	6	20,7	4	13,8	3	10,4
14. <i>Staphylococcus aureus</i>	0	–	1	3,5	2**	6,9
15. <i>Candida</i> spp.	4	13,8	0	–	–	–
16. «Стерильные» зубы	–	–	2	6,9	10	34,5

*часть штаммов впервые выявлена на этапах эндодонтического лечения

**все штаммы впервые выявлены на этапах эндодонтического лечения

Streptococcus sanguis, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*. Так, *Streptococcus sanguis* обнаруживали в 15 случаях из 29, что составляло 51,7%. *Streptococcus intermedius* определяли примерно у 1/3, а *Streptococcus mitis* – у 1/4 пациентов. Представители *Streptococcus mutans* обнаружены в корневых каналах зуба лишь у двух пациентов, что составило 6,9%. Представители облигатно-анаэробного рода *Peptostreptococcus* spp. и, как оказалось, единственного широко представленного в изучаемом содержимом факультативно-анаэробного *Enterococcus* spp. выделены у восьми пациентов (27,6%) для каждого рода бактерий.

Приблизительно у 1/4 пациентов также определяли представителей грамположительных палочек – актиномицетов и существенно реже – эубактерий и коринебактерий, что составило 6,9% и 10,4%.

Представители грамотрицательной облигатно-анаэробной

флоры по частоте обнаружения разных видов варьировали от 37,9% *Prevotella nigrescens* до 13,8% *Porphyromonas gingivalis*. За исключением последнего вида частоту выделения этих вирулентных бактерий следует признать довольно высокой. Так, пародонтопатогенный вид – *Tannerella forsythia* выделяли более чем у 1/4, а *Fusobacterium* spp. – у 1/5 пациентов.

Также было выявлено из содержимого корневых каналов у трех пациентов из 29 дрожжеподобных грибов рода *Candida*, что составило 13,8%.

После проведения обработки 3% раствором гипохлорита натрия корневых каналов мы наблюдали изменение состава микробной флоры. Но в большинстве случаев исследуемый материал не был стерильным, только у двух больных (6,9%) с язвенным пульпитом не выделено ни одного вида микробы. У 27,1%

пациентов сохранялась частота выделения некоторых стрептококков, в частности *Streptococcus sanguis* и *Peptostreptococcus* spp. у 17,4% пациентов. У 17,4% пациентов выделяли представителей *Actinomyces* spp., преимущественно вида *Actinomyces odontolyticus*.

В 10,4-13,8% больных сохранялись грамотрицательные облигатно-анаэробные бактерии пародонтопатогенной группы. Из них только представители *Porphyromonas gingivalis* обнаружены у одного пациента (3,5%). Впервые у одного больного выявлены представители вирулентного вида *Staphylococcus aureus*. После обработки 3% NaOCL не обнаруживали грибы *Candida* spp.

После применения гидроокиси меди-кальция отмечалось изменение состава микробной флоры, при повторном заборе содержимого корневого канала для лабораторного исследования, прово-

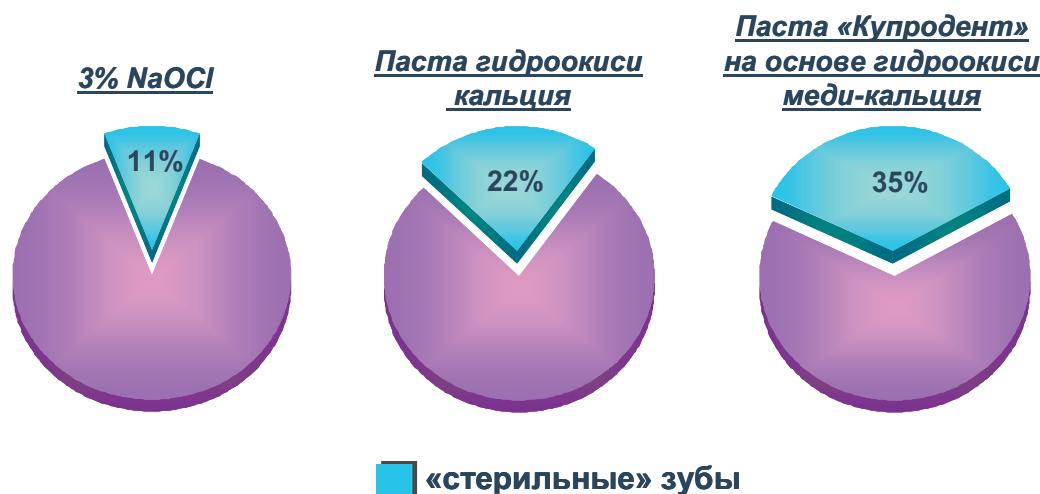


Рис. 1

димого непосредственно перед обтурацией корневого канала. У 10 пациентов (34,5%) микрофлора не выявлялась (табл. 3). Из 15 родов микробов, представители которых определялись до начала лечения, выявлены только девять.

В пять раз сократилась частота выделения *Streptococcus sanguis*, она составила 10,4%, в восемь раз – *Peptostreptococcus* spp. Другие виды кокков микроаэрофильной группы не определялись. Напротив, довольно высокой оказалась частота выделения представителей энтерококков – этот показатель сократился всего в два раза от исходного и составил 13,8%. Частота выделения представителей грамотрицательной пародонтопатогенной флоры, по сравнению с исходной частотой, сократилась от двух *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium* spp. до пяти раз *Prevotella nigrescens*. Наиболее значительной была частота выделения представителей двух вирулентных видов – *Tannerella forsythia* и *Fusobacterium necroforum* (10,4% больных). Причем у одного пациента представители вида *Tannerella forsythia* выявлены впервые, то есть вследствие вторичной контаминации на этапах лечения.

Также выявлены впервые и представители вирулентного вида *Staphylococcus aureus*, частота составила 6,9%. После применения гидроокиси меди-кальция грибы *Candida* spp. не выявляли ни у одного пациента.

В результате исследования было установлено изменение видового состава вирулентной микрофлоры на этапах эндодонти-

ческого лечения. В контрольной группе в результате обработки каналов корней 3% раствором NaOCL отмечено снижение обсемененности, количество стерильных зубов составило 11,1%. В группе сравнения после применения 3% NaOCL и пасты гидроокиси кальция микрофлора не выявлялась у 22,2% пациентов. В основной группе, после применения препарата «Купродент», содержащего гидроокись меди-кальция, микрофлора не выявлялась у 34,5% (рис. 1).

Следовательно, в результате проведенного исследования было выявлено, что при анализе микробной флоры в содер- жимом корневых каналов у пациентов с язвенным пульпитом проявлены ассоциации от двух до девяти видов бактерий, которые относились преимущественно к микроаэрофильным или облигатно-анаэробным ви- дам. Установлены изменения видового состава вирулентной микрофлоры на этапах эндо- донтического лечения, из чего следует, что традиционная обработка системы корневых каналов является недостаточной для воздействия на агрессивную микрофлору и для лечения хро-нического язвенного пульпита, в сравнении с применением гидроокиси кальция и гидроокиси меди-кальция, что выражается в уменьшении количества микробной обсемененности в корневых каналах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бир Р., Бауман М., Ким С. Эн-донтология: монография / Пер. с

англ.; под ред. проф. Т.Ф. Виноградовой. – М.: МЕДпрессинформ, 2004. – 368 с.

2. Боровский Е. В. Клиническая эндодонтия. – Изд. 2-е, доп. и испр. – М.: АО «Стоматология», 2003. – 176 с.

3. Максимовский Ю. М., Чиркова Т. Д., Соколова О. Р., Прудникова О. А. Необходимость внутриканального применения медикаментозных препаратов при эндо-донтическом лечении // Новое в стоматологии. 2001. №6. С.46-53.

4. Царев В. Н., Ушаков Р. В. Антимикробная терапия в стоматологии: Руководство. – М.: Медицинское информационное агентство, 2006. – 144 с.

5. Ezzo P. J., Culter C. W. Microorganism as risk indicators for periodontal disease // Periodontal 2000. 2003. Vol. 32. P. 24-35.

6. Kinane D. F. Etiology and pathogenesis of periodontal disease // Ann. R. Australas Cool. Dent.Surg. 2000. Vol. 15. P. 42-50.

7. Siquera J. F. Jr., Rocas I. N., Souto R., Uzeda M. de, Colombo A. P. Actinomyces species, Streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections // J. Endod. 2002. Mar. №28 (3). P. 168-172.

Поступила 23.05.2011

Координаты для связи с авторами:
127006, г. Москва,
ул. Долгоруковская, д. 4