

# Aspek Molekuler dan Histopatologik Kanker Kolorektal yang Resisten Terhadap 5-Fluorouracil

Shirley Kristina  
Ening Krisnuhoni  
Endah Zuraidah  
Departemen Patologik Anatomik  
Fakultas Kedokteran  
Universitas Indonesia  
Jakarta

## ABSTRAK

Kanker kolorektal merupakan salah satu jenis kanker yang sering terjadi di dunia. Penanganan kanker kolorektal dapat berupa terapi pembedahan, kemoterapi, terapi radiasi, dan terapi target. Agen kemoterapi 5-Fluorourasil (5-FU) banyak digunakan sebagai terapi tambahan pada kanker kolorektal dengan pembedahan, maupun sebagai terapi paliatif pada kanker kolorektal yang sudah mengalami metastasis. Sebagian kanker kolorektal tidak memberikan respon yang baik terhadap agen kemoterapi ini. Pemahaman mekanisme kerja 5-FU dan respon seluler diperlukan untuk mengetahui penyebab resistensi kanker kolorektal, sehingga membantu menghindari pemberian kemoterapi 5-FU yang tidak efektif. Mekanisme *mismatch repair* (MMR) merupakan respon sel yang berperan penting dalam sensitivitas kemoterapi 5-FU. Mutasi genetik maupun epigenetik pada gen MMR menyebabkan kanker kolorektal mengalami resistensi terhadap kemoterapi 5-FU. Gangguan MMR juga berhubungan dengan adanya *microsatellite instability* (MSI). Kanker kolorektal dengan MSI yang tinggi (*MSI-high/MSI-H*) merupakan kelompok yang resisten terhadap kemoterapi 5-FU. Kelompok ini meliputi sebagian kanker kolorektal tipe sporadik dan HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*). Pemeriksaan status MMR dan MSI pada kanker kolorektal akan sangat membantu untuk memprediksi respon kemoterapi 5-FU, sekaligus menentukan prognosis pasien.

**Kata kunci:** kanker kolorektal, *mismatch repair*, *microsatellite instability*, resistensi 5-Fluorourasil

## PENDAHULUAN

Kanker kolorektal merupakan salah satu jenis tumor yang tersering di dunia, yaitu meliputi 10% dari seluruh insidensi tumor.<sup>1</sup> Berdasarkan data Badan Registrasi Kanker Indonesia tahun 2011, kanker kolorektal termasuk dalam 10 besar kanker yang paling sering terjadi pada pria dan wanita di Indonesia. Kanker rektum menduduki peringkat ke-4 dengan jumlah kasus sebesar 1414 dan kanker kolon menduduki peringkat ke-9 dengan jumlah kasus sebesar 996.<sup>2</sup>

Kanker kolorektal dapat terjadi melalui berbagai jalur mekanisme, yaitu jalur *chromosomal instability* (CIN), jalur *microsatellite instability* (MSI), jalur *CpG Island Methylator Phenotype* (CIMP), serta jalur *serrated neoplasia*. Jalur-jalur ini tidak sepenuhnya berdiri sendiri, karena dapat ditemukan bentuk campuran. Profil molekuler kanker kolorektal dapat memberikan informasi yang penting, seperti status MSI yang memberikan informasi untuk penentuan terapi dan prognosis pasien.<sup>3</sup>

Penanganan kanker kolorektal dapat berupa terapi pembedahan, kemoterapi, terapi radiasi, dan terapi target.<sup>4</sup> Agen kemoterapi 5-Fluorourasil (5-FU) telah lama digunakan sebagai komponen standar kemoterapi kanker kolorektal.<sup>5</sup> Sebagian kanker

kolorektal yang mendapatkan kemoterapi 5-FU tidak mengalami efek terapi seperti yang diharapkan. Kanker kolorektal dengan gangguan *mismatch repair* (MMR) mendapat perhatian sebagai kelompok yang resisten terhadap agen kemoterapi ini. Gangguan MMR berhubungan dengan *microsatellite instability* (MSI). Kemampuan untuk dapat menentukan status MMR dan MSI pada kanker kolorektal diperlukan untuk menghindari pemberian kemoterapi 5-FU yang tidak efektif sekaligus untuk mengetahui prognosis pasien.<sup>6-7</sup>

Penulisan tinjauan pustaka ini bertujuan untuk membahas mekanisme kerja 5-FU sebagai agen anti-tumor, respon sel yang terjadi, peran mekanisme *mismatch repair* dalam sensitivitas kemoterapi 5-FU, *microsatellite instability* pada kanker kolorektal dengan gangguan MMR, serta peran pemeriksaan patologi anatomi untuk memprediksi respon kanker kolorektal terhadap kemoterapi 5-FU dan menentukan prognosis berdasarkan status MMR dan MSI.

### **Mekanisme Kerja 5-Fluorouracil**

Agen kemoterapi 5-Fluorouracil (5-FU) merupakan analog pirimidin (Urasil) yang bekerja secara spesifik pada sel-sel yang sedang menjalani siklus sel, yaitu pada fase S (sintesis). Efek anti-tumor yang kuat didapatkan dari penggabungan 5-FU dengan DNA. Salah satu metabolit 5-FU, yaitu *fluorodeoxyuridine monophosphate* (FdUMP), akan menghambat sintesis *deoxythymidine monophosphate* (dTMP) dari *deoxyuridine monophosphate* (dUMP), sehingga menyebabkan akumulasi dUTP (*deoxyuridine triphosphate*) dan FdUTP (*fluoro-deoxyuridine triphosphate*), serta deplesi *deoxythymidine triphosphate* (dTTP).<sup>6-8</sup>

Penurunan kadar dTTP menyebabkan dTTP digantikan oleh dUTP dan FdUTP sebagai substrat untuk membentuk untai DNA yang baru. Hal ini menyebabkan kesalahan pasangan basa pada DNA. Adenin yang seharusnya berpasangan dengan Timin akan berpasangan dengan Urasil atau Fluorourasil. Guanin yang seharusnya berpasangan dengan Sitosin akan berpasangan dengan Urasil atau Fluorourasil.<sup>6-8</sup>

### **Respon Sel Terhadap Kemoterapi 5-Fluorourasil**

Sel akan menghentikan proses replikasi sebagai respon awal terhadap kerusakan DNA. Pada

mekanisme MMR yang berfungsi dengan baik, protein MMR, yaitu kompleks MSH2 (*MutS homolog 2*) dan MSH6 (*MutS homolog 6*), akan mendeteksi kesalahan pasangan basa dan membuat siklus sel terhenti di fase G2 untuk upaya perbaikan DNA. Mekanisme perbaikan DNA yang terlibat adalah *base excision repair* (BER) dan *mismatch repair* (MMR). Kedua mekanisme ini bekerja secara simultan pada DNA.<sup>8-9</sup>

Mekanisme *base excision repair* (BER) akan memperbaiki basa yang salah pada DNA, terutama pada pasangan Fluorourasil atau Urasil dengan Adenin. Tingginya rasio dUTP dan dTTP menyebabkan banyak sekali penggabungan dUTP dan FdUTP pada DNA, serta sangat sedikit dTTP yang tersedia untuk menggantikannya. Mekanisme ini pada akhirnya tidak mampu mengatasi kerusakan DNA tersebut.<sup>6</sup>

Mekanisme *mismatch repair* (MMR) bekerja secara spesifik pada kesalahan pasangan basa Fluorourasil atau Urasil dengan Guanin.<sup>11</sup> Mekanisme ini berperan penting karena sedikitnya setengah dari Fluorourasil yang bergabung pada DNA berpasangan dengan Guanin. Kompleks MSH2-MSH6 akan mengenali lesi ini pada DNA, kemudian kompleks MLH1 (*MutL homolog 1*) dan PMS2 (*Post-meiotic segregation 2*) menentukan untai DNA yang akan diperbaiki. Beberapa nukleotida dibuang oleh enzim *Exonuclease* (Exo1) dan langsung digantikan oleh nukleotida-nukleotida baru yang dibentuk oleh *DNA polymerase*  $\beta$ . (Gambar 1b).<sup>8,12</sup>

Kerusakan DNA akibat paparan 5-FU tidak berhasil diperbaiki baik melalui jalur BER maupun MMR, karena *DNA polymerase*  $\beta$  akan kembali menggabungkan FdUTP dan dUTP pada DNA.<sup>13</sup> Kerusakan DNA yang terjadi pada MMR akan lebih berat dibandingkan dengan BER karena jumlah nukleotida yang dieksisi pada MMR lebih banyak, sehingga kesalahan pasangan basa yang terbentuk juga akan lebih banyak. Hal ini membuat siklus MMR terus berulang dan akhirnya menyebabkan untai ganda DNA terputus, sehingga terjadi apoptosis. Mekanisme MMR yang rusak (*deficient MMR/dMMR*) menyebabkan kegagalan proses kematian sel (apoptosis), sehingga sel akan resisten terhadap efek kemoterapi 5-FU.<sup>9</sup>

### Kanker Kolorektal yang Berhubungan dengan Gangguan MMR

Sekitar 15% kanker kolorektal terjadi akibat gangguan pada gen *mismatch repair* (MMR). Gangguan ini menyebabkan sel tidak mampu untuk memperbaiki kesalahan pasangan basa pada DNA dan meningkatkan akumulasi mutasi spontan yang berisiko untuk terjadinya kanker.<sup>12,14</sup> Kanker kolorektal dengan gangguan MMR ditandai dengan adanya *microsatellite instability* yang tinggi (MSI-H). Mikrosatelit, atau yang disebut juga *simple sequence repeat*, merupakan pengulangan satu sampai enam nukleotida yang tersebar di seluruh genom. Daerah ini rentan mengalami ketidakstabilan akibat kesalahan insersi atau delesi saat replikasi DNA. Lokus mikrosatelit dapat memendek atau memanjang dan menyebabkan timbulnya ketidakstabilan genetik yang disebut *microsatellite instability*. Kondisi ini ditandai dengan besarnya variasi mikrosatelit pada DNA (*microsatellite instability* yang tinggi / MSI-H).<sup>12-13</sup>

MSI jelas ditemukan pada HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) atau yang disebut sebagai sindroma Lynch. Kondisi ini meliputi kurang dari 5% kasus kanker kolorektal. Sindroma Lynch diturunkan secara autosomal dominan dan disebabkan oleh mutasi germinal yang terjadi setidaknya pada salah satu gen MMR, yaitu *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, dan *MSH6*.<sup>4,14</sup> Mutasi paling banyak terjadi pada *MLH1* dan *MSH2* (80-90%), serta jarang pada *MSH6* (10%) dan *PMS2* (5%). Inaktivasi gen *MSH2* juga dapat terjadi akibat delesi exon 3 pada gen *EPCAM* (*Epithelial cell adhesion molecule*).<sup>14,15-16</sup>

Sekitar 15% kanker kolorektal tipe sporadik memiliki gangguan pada gen MMR. Kanker ini lebih banyak ditemukan pada wanita dan terjadi akibat hipermetilasi pada gen MMR, yaitu *MLH1*, dan berhubungan dengan adanya mutasi *BRAF* (Gambar 2). Metilasi pada regio promoter *MLH1* akan menyebabkan faktor transkripsi tidak dapat menempel pada promoter, sehingga ekspresi gen *MLH1* akan menghilang (*silencing*).<sup>3,12,14,15</sup>

### Gambaran Klinis dan Histopatologi Kanker Kolorektal dengan MSI-H

*Microsatellite instability* yang tinggi (MSI-H) dapat ditemukan pada berbagai varian kanker kolorektal, antara lain adenokarsinoma musinosa, karsinoma *signet ring cell*, dan karsinoma meduler. Tumor dengan status MSI-H diprediksi

bersifat seperti tumor dengan derajat rendah. Tumor dengan *microsatellite instability* yang rendah (*MSI-Low* / MSI-L) atau *microsatellite stable* (MSS) diprediksi memiliki sifat lebih agresif seperti tumor dengan derajat tinggi atau yang berdiferensiasi buruk, terutama jika terdeteksi pada stadium lanjut. Karsinoma kolorektal tipe meduler berhubungan kuat dengan status MSI-H, sehingga biasanya memiliki prognosis yang baik, meskipun tumor memiliki gambaran differensiasi yang buruk.<sup>17-18</sup>

Kanker kolorektal dengan status MSI-H, baik dari tipe sporadik atau HNPCC, memiliki beberapa karakteristik yang sering ditemukan, seperti lokasi tumor yang terutama terletak di sisi kanan (kolon proksimal), stadium tumor yang lebih rendah saat didiagnosa, tumor cenderung terlokalisir, adanya infiltrasi limfosit pada tumor, gambaran pertumbuhan yang eksponsif, komponen musinosa dan *signet ring cells*, serta gambaran yang meduler.<sup>15,19</sup> Perbedaan gambaran klinikopatologis dapat ditemukan antara kanker kolorektal MSI-H tipe sporadik dan HNPCC, serta antara kanker kolorektal MSI-H dan kanker kolorektal MSI-L atau MSS. Perbedaan ini dapat digunakan untuk memprediksi status molekuler tumor (Tabel 1).<sup>13</sup>

### Pemeriksaan Status MSI dan MMR Pada Kanker Kolorektal

Status MSI dan MMR pada kanker kolorektal dapat dipastikan dengan menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan pemeriksaan imunohistokimia.<sup>12</sup>

### Pemeriksaan Mikrosatelit dengan PCR

Pemeriksaan mikrosatelit dilakukan dengan menggunakan DNA dari jaringan tumor yang telah *di-embedding* dengan parafin dan dari jaringan non-neoplastik sebagai pembanding. WHO merekomendasikan pemeriksaan mikrosatelit untuk karsinoma kolorektal dengan menggunakan 5 standar referensi, yaitu dua sekuen mononukleotida berulang (BAT25 dan BAT26), serta tiga sekuen dinukleotida berulang (D5S346, D2S123, dan D17S250).<sup>7,15</sup> Berdasarkan jumlah penanda yang positif, status MSI pada kanker kolorektal dibedakan menjadi MSI-H yang memiliki ketidakstabilan pada 2 atau lebih penanda, MSI-L yang memiliki ketidakstabilan pada 1 dari 5 penanda, dan MSS yang stabil pada seluruh penanda.<sup>14,20</sup> Kanker kolorektal dengan MSI-H memiliki angka kesintasan

yang lebih baik dibandingkan dengan kanker

kolorektal dengan MSS atau MSI-L.<sup>12,17</sup>

Tabel 1. Perbandingan gambaran klinis dan histopatologis tumor kolorektal tipe MSS/MSI-L, MSI-H HNPCC, dan MSI-H tipe sporadik.<sup>13</sup>

Gambaran Klinikopatologis	MSS/MSI-L	MSI-H	
		HNPPC	Tipe Sporadik
Usia Rata-Rata	57.2 tahun	41.9 tahun	69.4 tahun
Lokasi Tumor	Kolon sisi kiri	Kolon sisi kanan	Kolon sisi kanan
Stadium	III-IV	I-II	II-III
Gambaran Histologis	Glandular	Campuran meduler dan glandular	Meduler
Musin	Musin ekstrasel tanpa <i>signet ring cells</i>	Musin ekstrasel dengan <i>signet ring cells</i>	Musin ekstrasel dengan <i>signet ring cells</i>
Debris Nekrosis	+	-	-
Gambaran Invasi	Infiltratif	Ekspansif	Ekspansif
Inti Sel	Pleomorfik, hiperkromatik	Uniform, besar, jernih, anak inti menonjol	Vesikuler, berlobus, anak inti menonjol
Infiltrasi Limfosit	-	Jelas ditemukan	Sering ditemukan
Intratumor			
Infiltrasi Limfosit pada Stroma	Jarang	Sering	Jarang
Polip di Sekitar Mukosa	Adenoma tubuler	-	Adenoma <i>serrated</i> , polip hiperplastik

### Pemeriksaan Protein MMR dengan Imunohistokimia

Pemeriksaan protein MMR pada kanker kolorektal dengan imunohistokimia (IHK) lebih sederhana dibandingkan pemeriksaan MSI dengan PCR. Pemeriksaan IHK mengidentifikasi kelainan gen *MMR* dengan cara melihat ekspresi protein yang merupakan produk gen tersebut.<sup>12,14</sup> National Comprehensive Cancer Network (NCCN) merekomendasikan pemeriksaan IHK pada 4 protein, yaitu MSH2, MLH1, MSH6, dan PMS2. Pemeriksaan IHK sangat spesifik (100%) dan sensitif (92.3%) untuk mendeteksi tumor dengan MSI-H.<sup>21-22</sup>

Gangguan MMR tampak dari hasil IHK yang negatif, yaitu jika ekspresi protein MMR benar-benar hilang sepenuhnya pada pewarnaan inti sel epitel tumor. Hasil ini sangat berbeda jika dibandingkan dengan hasil positif pada pewarnaan inti sel epitel normal, sel stroma, atau limfosit di sekitarnya (Gambar 6). Hasil pemeriksaan IHK terhadap protein MMR sangat berhubungan dengan hasil pemeriksaan MSI. Tumor dengan gangguan MMR memiliki status MSI-H dan akan negatif dengan pemeriksaan IHK. Tumor dengan MMR yang baik memiliki status MSS atau MSI-L dan akan positif dengan pemeriksaan IHK.<sup>15</sup> Hasil IHK yang negatif pada protein selain MLH1 lebih mengarah pada HNPCC. Pemeriksaan mutasi BRAF juga akan membantu membedakan kanker kolorektal MSI-H tipe sporadik dengan HNPCC. Hasil pemeriksaan IHK ini akan membantu memprediksi respon

tumor terhadap kemoterapi 5-FU, serta menentukan prognosis secara molekuler.<sup>20</sup>

### RANGKUMAN

Agen kemoterapi 5-Fluorourasil (5-FU) menyebabkan efek toksik pada tumor melalui kerusakan pada DNA. Kematian sel (apoptosis) akan terjadi karena kerusakan DNA yang tidak berhasil diperbaiki. Gangguan pada gen *MMR* membuat sel tidak dapat merespon efek kemoterapi 5-FU seperti seharusnya, sehingga sel tumor akan tetap hidup. Hal ini menyebabkan terjadinya resistensi terhadap kemoterapi 5-FU.

Gangguan mekanisme MMR berhubungan dengan *microsatellite instability* (MSI). Kanker kolorektal dengan MSI yang tinggi (MSI-H) merupakan kelompok yang resisten terhadap kemoterapi 5-FU. Kanker jenis ini memiliki beberapa karakteristik klinis dan histopatologis yang berbeda dari kanker kolorektal dengan MSS atau MSI-L. Perbedaan ini dapat membantu para ahli Patologi Anatomi untuk memprediksi status MSI tumor yang kemudian dipastikan dengan pemeriksaan IHK atau PCR. Informasi ini akan berguna untuk memprediksi respon kanker kolorektal terhadap terapi 5-FU, serta menentukan prognosis pasien.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih saya tujukan kepada dr. Ening Krisnuhoni, MS. SpPA(K) dan Ibu Endah Zuraidah, SSi., M.Epid. atas waktu, bimbingan dan dukungan yang sangat berharga dalam pembuatan makalah ini. Terima kasih juga saya

ucapkan kepada teman-teman Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Anatomi yang telah ikut memberi semangat dan dukungan dalam proses penyelesaian tinjauan pustaka saya. Semoga tinjauan pustaka ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Labianca R, Nordlinger B, Beretta D, Mosconi S, Mandala M, Cervantes A, et al. Early colon cancer : ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24:64-72.
2. Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia. Kanker di Indonesia tahun 2011: data histopatologik. Jakarta: Badan Registrasi Kanker; 2015.
3. Sohaily SA, Biankin A, Leong R, Corish MK, Warusavitarne J. Molecular pathway in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27:1423-31.
4. Rochanan AH, Sudoyo AW, Kurnianda D, Hukom R, Putro MD. Penatalaksanaan. In: Panduan Penatalaksanaan Kanker Kolo-rektal 2014. Jakarta: Perhimpunan Dokter Spesialis Bedah Digestif Indonesia; 2014. p. 42-52.
5. Panczyk M. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World J Gastroenterol.* 2014;20:9775-827.
6. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: mechanism of resistance and reversal strategies. *Molecules.* 2008;13: 1551-69.
7. Chu E, Sartorelli AC. Cancer chemotherapy. In: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, editors. Basic and clinical pharmacology. 12<sup>th</sup> ed. San Francisco: Mc Graw Hill America Inc; 2012. p. 949-60.
8. Li LS, Morales JC, Veigl M, Sedwick D, Greer S, Meyers M, et al. DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *Br J Pharmacol.* 2009;158:679-92.
9. Wyatt MD, Wilson DM. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:788-99.
10. D'Andrea AD. DNA repair pathways and human cancer. In: Mendelsohn J, Gray JW, Howley PM, Israel MA, editors. The molecular basis of cancer. Philadelphia: Saunders; 2015. p.47-50.
11. Liu A, Yoshioka K, Salerno V, Hsieh P. The mismatch repair-mediated cell cycle checkpoint response to fluorodeoxyuridine. *J Cell Biochem.* 2008;105:245-54.
12. Tan D. Molecular diagnostics of colorectal cancer. In: Tan D, Lynch HT, editors. Principles of molecular diagnostics and personalized cancer medicine. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 339-55.
13. Toth E, Serester O, Gallai M, Gurzu S, Jung I, Szentirmay Z. Molecular pathways and pathomorphology of colorectal cancers. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52:767-73.
14. Sinicrope FA. DNA mismatch repair and adjuvant chemotherapy in sporadic colon cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7:174-7.
15. Hall G, Clarkson A, Shi A, Langford E, Leung H, Eckstein RP, et al. Immunohistochemistry for PMS2 and MSH6 alone can replace a four antibody panel for mismatch repair deficiency screening in colorectal adenocarcinoma. *Pathology.* 2010;42:409-13.
16. Peltomaki P, Offerhaus GJA, Vasen HFA. Lynch syndrome. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. WHO classification of tumours of the digestive system 4<sup>th</sup> ed. France: Lyon; 2010. p.152-5.
17. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, Ilyas M, Morreau H, Nakamura SI, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. WHO classification of tumours of the digestive system 4<sup>th</sup> ed. France: Lyon; 2010. p.132-46.
18. Fleming M, Ravula S, Tatishev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3:153-173.
19. Shia J. Evolving approach and clinical significance of detecting DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 2015.
20. Sinicrope FA, Yang ZJ. Prognostic and predictive impact of DNA mismatch repair in the management of colorectal cancer. *Future Oncol.* 2011;7:467-74.
21. Provenzale D, Jasperson K, Ahnen DJ, Cannon JA, David DS, Early DS, et al. Genetic/familial high-risk assessment: colorectal. Version 2. [Internet] National Comprehensive Cancer Network. 2014. [cited 2015 April 16]. Available from:

[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_colon.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_colon.pdf)  
22. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the

Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet.* 2009;76:1-18.