

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ОПТИМИЗАЦИЯ ФАРМАКОТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОМЕТАЛЛОВ ПРИ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИИ С НПВС

THE OPTIMIZATION OF PHARMACOTHERAPEUTIC ACTIVITY UPON THE COMPLEX FORMATION BETWEEN BIOMETALS AND NON- STEROID ANTI-INFLAMMATORY COMPOUNDS

А.С. Григорьева
A.S. Grigorieva

Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, ул.Э.Потье, 14, Киев, 1403057, Украина.
Institute of Pharmacology and Toxicology, Ukraine Academy of Medical Sciences, E. Potie Str., 14, 03057, Kiev, Ukraine.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: комплексы металлов, фармакотерапевтические агенты, механизм действия.
KEY WORDS: metal complexes, pharmacotherapeutic agents; mechanism of activity.

РЕЗЮМЕ: Показано, что комплексообразование способно оптимизировать и расширить диапазон физиологических эффектов биометаллов и НПВС лекарств-лигандов. Подходы координационной химии позволили создать реальные эффективные терапевтические агенты на основе комплексов металлов, их композиционных и липосомальных систем.

SUMMARY: The consequence of complexation has proved its worth in optimization, and expansion of physiological effect diapason of biometals and NSAID drug-ligands. Approaches of coordination chemistry allowed to propose metal complexes, its compositions and liposomic systems as a real effective therapeutic agents.

Эволюция роли соединений металлов в медицине драматична и противоречива. Исторически функции металлосодержащих препаратов сводились к прямому цитотоксическому влиянию, участию в поддержании кислотно-щелочного и солевого баланса или определялись радионуклидной спецификой. Такой подход априорно ограничивал сферу реального терапевтического использования металлов жесткими антибактериальными (Hg, Ag, Au, Pb), антацидными (Al, Mg, Bi) и диагностическими (^{99}Tc , ^{67}Ga , ^{111}In , ^{57}Co) агентами (European Pharmacopoeia, 1997; Компендиум, 2000). Этот перечень дополняют отдельные примеры применения железа и кобальта для стимуляции гемопоэза.

С физико-химических позиций все эти металлосодержащие препараты представляли исключительно ионные формы металлов — тривиальные простые соли или оксиды. Для таких форм *in vivo* характерны

связанная с гидрофильностью низкая биодоступность (не более 20% вводимого металла), провоцирующее прооксидантное влияние, высокая токсичность и склонность к кумуляции (Albert, 1989). Именно эти негативные физиологические свойства в свое время обусловили неоднозначное восприятие перспектив металлотерапии.

Однако установление достоверного дисбаланса содержания металлов в организме, сопровождающего многие патологические состояния (Крисс и др., 1986), актуализировало проблему коррекции гомеостаза экзогенными соединениями металлов. Принципы гомеопатии или модифицирования транспорта металлов не могут решить эту проблему, так как они также ориентированы на применение ионных металлосодержащих веществ или индивидуальных металлов.

В качестве реальной альтернативы ионным соединениям предложены синтетические комплексы биометаллов с лигандами-лекарствами, образование которых приводит к оптимизации, синергизму и расширению диапазона физиологических эффектов обоих партнеров.

Подтверждение этой концепции получено нами при дизайне металлофармакофоров на основе лигандов класса нестероидных противовоспалительных агентов (НПВС—карбоновые кислоты). Выбор металлов в качестве партнеров НПВС осуществлен с учетом биологических функций эндогенных металлов, а также их специфики для патогенеза воспаления (d-металлы и Al) (Крисс и др., 1986).

Первым следствием комплексообразования стало значительное снижение острой токсичности комплексов по сравнению с таковой не только для солей

ТАБЛИЦА 1.
ПОКАЗАТЕЛИ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
КОМПЛЕКСОВ МЕТАЛЛОВ С НПВС.

Соединение ¹	Острая токсичность, LD ₅₀ , мг/кг	Противовоспалительная активность, % ² через:		Содержание металла в соединении, %
		1 час	24 часа	
HL _I ³	150	9,0	40,2	—
Cu(L _I) ₂	740	15,0	56,2	11,4
Zn(L _I) ₂	1290	13,6	43,7	11,6
Fe(L _I) ₃	1410	12,9	84,0	7,1
Co(L _I) ₂	570			10,6
Mn(L _I) ₂	1530			9,9
Cr(L _I) ₃	1290			6,6
Al(L _I) ₃	1460	6,8	89,7	3,6
HL _{II} ⁴	165	43,0	40,3	—
Cu(L _{II}) ₂	1700	28,3	75,4	10,0
Zn(L _{II}) ₂	2290	25,0	48,3	10,3
Fe(L _{II}) ₃	3050	19,8	88,5	6,3
Al(L _{II}) ₃	3300	20,4	94,7	3,1
ККМ [M _n L _{II(m)}] ⁵	2820	34,3	73,0	3,9

¹ В формулах комплексов опущен координированный растворитель.

² Противовоспалительная активность указана в параметрах ингибирования отека при дозах 8 мг/кг (комплексы) или 25 мг/кг (лиганды).

³ N-2,3-диметилфенилантраниловая кислота (НПВС — “мефенаминовая кислота”).

⁴ N-3-трифторметилфенилантраниловая кислота (НПВС — “флюфенаминовая кислота”).

⁵ ККМ — композиция комплексов металлов с мефенаминовой кислотой — {(Fe³⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Cr³⁺)L_{II(m)}}.

металлов, но и свободных лигандов (табл. 1) (Крисс и др., 1986; Григорьева и др., 1998). Этот эффект количественно коррелирует с изменением токсичности лиганда, однако для комплексов набора металлов с одним лигандом характер токсичности определяется природой металла. LD₅₀ комплексов изменяется в ряду: Co > Cu > Cr > Zn > Fe > Mn > Al. Порядок изменения токсичности комплексов не совпадает с таковым для солей тех же металлов (где LD₅₀: Zn > Cr >> Cu >> Fe), а также не коррелирует с содержанием металла в соединении (табл. 1). Координация НПВС с металлами обуславливает и нивелирование побочных ulcerогенных и гепатотоксических эффектов НПВС.

На фоне уменьшения токсичности комплексообразование приводит к повышению и существенной пролонгации противовоспалительного эффекта НПВС (табл. 1) (Крисс и др., 1986; Grigorieva et al., 1986). Противовоспалительный эффект комплексов М-НПВС возрастает в течение 24 часов и остается стабильным на протяжении 3–5 суток.

В ряду координационных и ионных соединений металлов отсутствует количественная зависимость между показателями специфической фармакологической активности и общим содержанием металла (табл. 1). Простые соли при наивысшем содержании

металла обладают наименьшим терапевтическим индексом.

Установленные закономерности соответствуют представлению о комплексе металла как о самостоятельной в фармакологическом и токсикологическом аспекте субстанции, а не о механическом провайдере металла.

Можно полагать, поэтому, что оптимизация фармакологического эффекта ионов металлов и лекарственных лигандов вследствие комплексообразования связана с изменением природы их связи в составе комплексов. Физико-химические свойства последних соответствуют критериям фармакологической активности.

Так, индивидуальные комплексы М-НПВС с простейшей формулой ML_n:

— термодинамически стабильны при физиологических рН или липидорастворимы (Григорьева и др., 1990);

— имеют кластерную структуру (структурные мотивы {M₂} или {M₃O}), в которой ионы металлов находятся в плотном гидрофобном окружении лиганда, координированного по карбоксилатному мостиковому типу (Григорьева и др., 1990);

— на молекулярном уровне обла- дают ферментимитирующей активностью в каталазных и оксидазных реакциях, выступают в качестве антиоксидантов в свободно-радикальных процессах (Григорьева и др., 1985);

— могут образовываться в эндогенных процессах связывания металла с лигандом из активных центров металлоферментов (например, церулоплазмина, алкогольдегидрогеназы и т.п.) (Григорьева и др., 1983). В результате этих реакций возрастает каталитическая активность систем (HL + металлофермент® ML_n + апо-фермент).

Варьирование металла позволяет получить на основе одного органического фармакофора (например, мефенаминовой кислоты, HL_I) комплексы с различной специфической фармакологической активностью, диапазон которой существенно шире, чем у свободного лиганда. Более того, физиологически активное соединение образуется при комплексообразовании соответствующего металла с неактивным лигандом (например, противовоспалительный комплекс CuL₂ с физиологически нейтральным изомером мефенаминовой кислоты — N-3,4-диметилфенилантраниловой кислотой (Григорьева и др., 1984)). В этот эффект может носить вклад как специфичность меди для данной патологии, так и влияние комплекса, как такового, на воспалительную компоненту патогене-

ТАБЛИЦА 2.
ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ПРЕПАРАТА “АНТРАЛЬ” (КОМПЛЕКС $Al(L_1)_3$) В КЛИНИКЕ
ХРОНИЧЕСКОГО АКТИВНОГО ГЕПАТИТА И VHB.

Показатель	До лечения	После лечения
АлАТ, ммоль/ч.л	3.4 ± 0.2	1.6 ± 0.6 *
АсАТ, ммоль/ч.л	1.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2 *
ЩФ, ммоль/ч.л	6.9 ± 1.4	3.4 ± 0.7 *
Общий билирубин, мкмоль/л	148.5 ± 24.1	39.4 ± 5.4 *
Тимоловая проба, ЕД	9.7 ± 1.2	6.2 ± 0.5 *
Цитохром Р450, нмоль/г	102 ± 37	212 ± 42 *
<i>Показатели иммунного статуса (периферическая кровь), % к норме:</i>		
- T_H	50	94 *
- B_1	145	91 *
- T_γ	46	100 *
- T_μ	125	107 *
Наличие HbsAq, %	100	60 *
<i>Длительность основных синдромов VHB (в сравнении со стандартной терапией, %)</i>		
- Интоксикационный		33.5 *
- Диспептический		41.2 *
- наступление желчного криза		43.8 *

* достоверно по отношению к показателю в контрольной группе пациентов при стандартной терапии.

за.

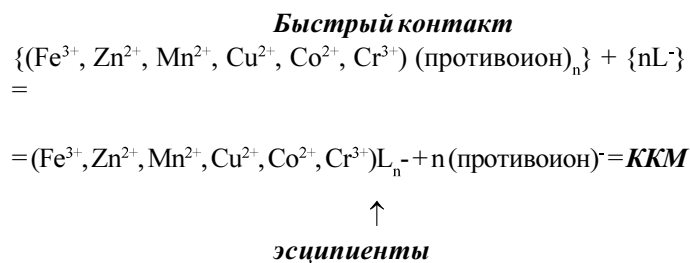
Высокая противовоспалительная активность комплексов М-НПВС связана, прежде всего, с их высокой липофильностью. Она обуславливает сродство комплексов к фосфолипидным слоям мембран, где комплекс реагирует с локализованными радикальными частицами и медиаторами воспаления.

Наиболее ярким примером физиологически активных соединений такого типа является комплекс алюминия с мефенаминовой кислотой $Al(L_1)_3$. Его высокий пролонгированный противовоспалительный эффект (табл. 1) сочетается с выраженным иммуномодулирующим и антивирусным (VHB) действием. Такое сочетание обусловило возможность применения AlL_3 в фармакотерапии хронических активных гепатитов различного генеза и циррозов печени у детей и взрослых в качестве нового противовоспалительного гепатопротектора “Антраль” (табл. 2) (Компендиум, 2000; Фролов и др., 2000).

Фармакологические последствия варьирования металла при конструировании координационного фармакофора могут максимально реализоваться в композиции комплексов. Это соответствует взаимному влиянию металлов в активных центрах ферментов: сосуществованию Cu, Fe и Zn in супероксиддисмутазе или взаимосвязи Cu и Fe в системах церулоплазмин-трансферрин и т.п. Такой подход гарантирует нормальный метаболизм каждого металла в последовательности: “депо – ферментная система – гомеос-

таз”.

Нами предложен метод т.н. “суммарного синтеза” композиции комплексов d-металлов (Fe, Zn, Mn, Cu, Co и Cr) с N-2,3-диметилфенилантраниловой кислотой (HL_1) – ККМ, реализуемый по следующей схеме:



При “суммарном синтезе” ККМ не образуются гетероядерные комплексы $(M_1-M_2)L_n$. Спектральные параметры ККМ (VIS, UF, IR, EPR) представляют собой суперпозицию соответствующих характеристик индивидуальных комплексов ML_n . Эффективный магнитный момент ККМ монотонно падает в температурном диапазоне (298–89) К, его величина ниже обусловленной спином парамагнитных металлов. Значение обменного интеграла ККМ стабильно и отрицательно ($J = -18,3 \text{ см}^{-1}$). Это свидетельствует об антиферромагнитной природе гомоядерных кластеров металлов в структуре ККМ.

Полученные данные исключают какое-либо взаимодействие между комплексами ML_n в ККМ. В то же

Таблица 3.

ПОКАЗАТЕЛИ АНТИСТРЕССОРНОГО ЭФФЕКТА КОМПОЗИЦИИ КОМПЛЕКСОВ МЕТАЛЛОВ С N-2,3-ДИМЕТИЛФЕНИЛАНТРАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ (ККМ).

Показатель	Норма	Стресс	Эффект ККМ
Эрозии слизистой желудка, кол-во ¹	0	7,7	1,0
<i>Масса органа (г/100 г веса тела)¹:</i>			
- надпочечники	0,023	0,031	0,022
- тимус	0,20	0,13	0,17
- селезенка	0,61	0,31	0,48
<i>Катехоламины в крови¹:</i>			
- норадреналин, мкг/мл	0,12	0,30	0,16
<i>Показатели периферической крови²:</i>			
- лейкоциты, 10 ⁹ /л	0,61	0,31	0,48
- нейтрофилы, 10 ⁹ /л	0,61	0,31	0,48
- лимфоциты, 10 ⁹ /л	0,61	0,31	0,48
<i>Показатели костного мозга²:</i>			
- миелокариоциты, 10/л	299	22	259
- Клетки Эритрона, %	22,2	8,2	17,2
- лимфоциты, %	0,61	0,31	0,48

¹ Модель психо-физического стресса у крыс.

² Модель радиационного стресса у крыс.

время, создание ККМ не приводит к синергизму или суммированию их токсичности: LD₅₀ ККМ выше, чем у любого из индивидуальных комплексов (табл. 1).

Для “полиметаллических” композиций можно прогнозировать соответствие многовариантной коррекции важнейших звеньев гомеостаза. Типичным примером патологических изменений такого рода является снижение резистентности организма при стрессе.

Действительно, для ККМ установлена стресс-лимитирующая компетентность, которая проявляется в предотвращении широкого спектра последствий стресса (табл. 3): напряжения адреналовой и лимфоидной систем, ulcerации слизистой желудка, нарушений метаболизма гликогена и характерных негативных изменений морфологического статуса внутренних органов. Особенно важно влияние ККМ на гемопоэз при различных стрессах (нервно-мышечном и радиационном): защита морфологического статуса периферической крови и костномозгового плацдарма кроветворения (Григорьева и др., 1999).

Гемопоэтической специфике соответствует баланс комплексов металлов в ККМ (мольное соотношение металлов: Fe : Zn : Mn : Cu : Co : Cr = 50:50:15:10:1:1). В то же время, в составе ККМ сделан акцент на относительное снижение содержания Fe в сравнении с известными композиционными препа-

ратами, содержащими ионные формы металлов-микроэлементов Компендиум, 2000; European Pharmacopoeia, 1997). Благодаря взаимному влиянию комплексов металлов, это не только не снизило антистрессорный эффект ККМ, но и позволило избежать нарушений метаболизма железа и его потенциальной кумуляции, сопровождающих применение известных Fe-содержащих лекарственных средств (Laufer, 1992).

С этой серьезной проблемой связаны как выраженные проявления токсикоза (типа гемосидероза или гемохроматоза), так и некробиотические изменения миокарда при стрессе. Кардиотоксичность Fe при этом идентифицируется т.н. реакцией Перлса — положительным гистохимическим окрашиванием ионного железа в миокарде (Меерсон, 1984). Нами впервые установлена положительная динамика кумуляции Fe в миокарде крыс при иммобилизационном стрессе (Рис. 1). Введение композиционных препаратов с ионными формами металлов (например, группы Юникап) потенцирует накопление Fe в сердечной мышце. При этом антистрессорный эффект ККМ, которая содержит этот металл в форме комплекса, не только нивелирует реакцию Перлса, но и обуславливает сохранение стабильного сердечного фона Fe (Рис. 1). Эти результаты относятся к наиболее впечатляющим фармакологическим преимуществам координационного статуса металлов.

Синтетические комплексы металлов с НПВС квази-амфифильны. В кластерах {M₂} или {M₃O} мостики лиганда образуют своеобразную гидрофобную “шубу” вокруг ионов металла. Это создает прекрасную возможность для реализации различных типов химической связи в процессах иммобилизации комплексов в носителях: ионных и ковалентных связей — на неорганических сорбентах, супрамолекулярных — в липосомальных системах. При этом целенаправленно достигается расширение их фармакотерапевтического диапазона.

Действительно, конструирование М-НПВС на катионообменнике-цеолите существенно пролонгировало анальгетическую активность и резко снизило токсичность иммобилизованных комплексов (ML){A} ({A} — алюмосиликатная матрица {(AlSi₅O₁₅H₄)_n}) (табл. 4) (Григорьева и др., 1990).

Липосомальная организация соединений металлов до недавнего времени ассоциировались исключительно с гидрофильными объектами, вовлекаемыми в водную полость липосом: диагностическими радиоизотопами (хлоридами или хелатами с некоторыми комплексами), а также — с противоопухолевым Цисплатином (Lasic, 1993). Их инкапсулирование в липосомах приводит к значительному снижению драматических токсических эффектов.

Мы впервые установили феномен липосомальной организации амфифильных комплексов металлов, которая предоставляет таким молекулам элегантную возможность включения в фосфолипидные бислои мембраны липосом. Супрамолекулярная природа таких металлолипосом (PC+MLn) (PC — фос-

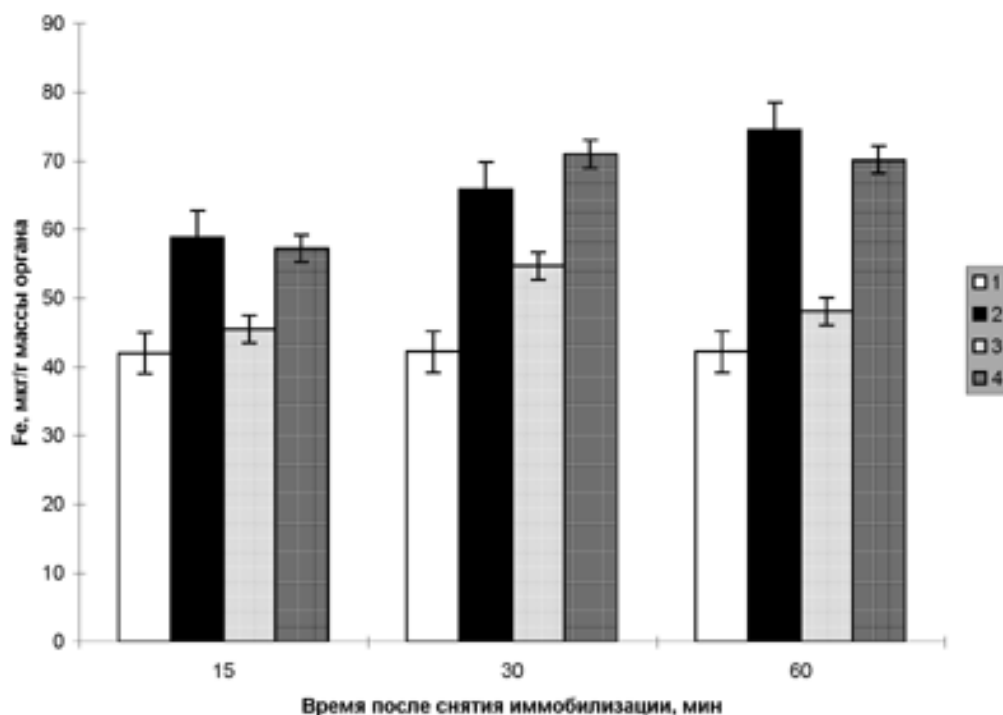


РИСУНОК 1. ВЛИЯНИЕ ККМ НА ДИНАМИКУ СОДЕРЖАНИЯ ЖЕЛЕЗА В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ: 1 — норма; 2 — иммобилизационный стресс; 3 — стресс + профилактическое введение ККМ; 4 — стресс + профилактическое введение композиции ионных соединений биометаллов.

ТАБЛИЦА 4.

ОПТИМИЗАЦИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА КОМПЛЕКСОВ МЕТАЛЛОВ С N-2,3-ДИМЕТИЛФЕНИЛАНТРАНИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА СОРБЕНТЕ И ВКЛЮЧЕНИИ В ЛИПОСОМЫ.

Система	LD ₅₀ , мг/кг	ТИ ¹	Гепатозащитный эффект, отн. ед, по: ⁴		
			ПОЛ ²	Цитолиз ³	Детоксикация
Cu(L ₁) ₂	740	1	0,5	0,5	0,3
Zn(L ₁) ₂	1290	2,6	1,0	1,0	1,0
Fe(L ₁) ₃	1410	1,5			
Al(L ₁) ₃	1460		1,0	1,0	1,0
<i>Иммобилизованные комплексы (ML₁)_n{A}</i> :					
(CuL ₁) _n {A}	> 5000	> 10			
(ZnL ₁) _n {A}	> 5000	> 8,7			
(FeL ₁) _n {A}	> 5000	> 10			
<i>Липосомы:</i>					
(PL+AlL ₃)	> 10000		4,1	1,9	2,0
(PL+CuL ₂)	> 6000		2,0	0,9	0,8

¹ ТИ = терапевтический индекс (LD₅₀/ ED₅₀) по анальгетическому эффекту через 6 часов.

² ПОЛ = перекисное окисление липидов.

³ Активность АлАТ как показатель цитолиза.

⁴ Показатели эффективности в условных единицах относительно нормы.

фатидилхолин) идентифицирована независимыми физико-химическими методами (Григорьева и др., 1995).

Для липосом (PC+AlL₃) характерна высокая толерантность (LD₅₀: 6000–10000 мг/кг) и гепатопротекторная активность, по параметрам которой они превосходят свободный комплекс AlL₃ (табл. 4) (Григорьева и др., 1995; Родионов и др., 2000). Являясь удобной формой для парэнтерального введения, созданный на основе липосом (PC+AlL₃) препарат “Лиолив” представляет реальную альтернативу известным гепатопротекторам. Наряду с гепатоспецифичностью фармакокинетики липосом (Lasic, 1993), механизм действия “Лиолива” связан с синергизмом мембранотропных, антиоксидантных и детоксицирующих эффектов компонентов металлолипосомальной композиции.

Экспериментальные и клинические результаты исследований комплексов биометаллов с НПВС не только подтверждают правомочность использования координационно-химических подходов для оптимизации физиологической активности микроэлементов, но и имеют прогностическое значение для расширения диапазона эффективных препаратов на основе соединений металлов.

Литература

- Григорьева А.С., Л.М. Киричек, Н.Ф. Конахович, Н.Ф. Турутина. 1990. Оптимизация фармакологических свойств лекарственных веществ, иммобилизованных на цеолитах // Тез. докл. III Укр. фарм. конф., Харьков, 1990. С.68.
- Григорьева А.С., Н.Ф. Конахович. 1982. Устойчивость комплексов металлов с производными антралиновой кислоты // Ж. неорг. химии. Т.27. № 5. С.1209–1216.
- Григорьева А.С., Н.Ф. Конахович, И.Н. Гавриш и др. 1983. Исследование состояния меди в активном центре церулоплазмина // Хим.-фарм. журн. Т.17. № 5. С.567–573.
- Григорьева А.С., Н.Ф. Конахович, В.В. Зеленцов. 1990. Трехъядерные кластеры железа (III) с производными антралиновой кислоты // Координ. химия. Т.16. № 5. С.646–649.
- Григорьева А.С., Н.Ф. Конахович, Е.Е. Крисс, Ю.А. Малетин. 1985. Взаимодействие между вердазильными радикалами и комплексами металлов с 3-трифторметилфенилантраниловой кислотой // Координ. химия. Т.11. № 12. С.1620–1625.
- Григор'єва А.С., Л.М. Киричек, А.С. Бацанов та ін. 1984. Протизапальна дія конформаційних ізомерів комплексу міді з 3,4-діметилфенілантраниловою кислотою // Фармацевтичн. журн. (укр.). № 2. С.41–46.
- Григор'єва Г.С., Л.М. Киричек, Н.Ф. Конахович та ін. 1998. Комплексоутворення як засіб підвищення нешкідливості сполук мікроелементів // Современные проблемы токсикологии. № 1. С.21–24.
- Григор'єва Г.С., Н.Ф. Конахович, А.В. Стефанов і ін. 1995. // Ліки (Drugs). № 4. Р.85–88.
- Григор'єва Г.С., Н.Ф. Конахович, Л.А. Френкель, М.А. Мохорт. 1999. Фармакологічна корекція постпромєневих станів та аномалій гемопоезу координаційними сполуками металів // Українськ. радіол. журн. Т.7. № 3. С.342–343.
- Компендиум 2000/2001 – Лекарственные препараты. 2000. Киев: Морион. 1456 с.
- Крисс Е.Е., Волченкова И.И., Григорьева А.С. и др. 1986. Координационные соединения металлов в медицине. Киев: Наукова думка. 216 с.
- Меерсон Ф.З.: 1984. Патогенез и профилактика стрессорных поражений миокарда. М.: Медицина. 272 с.
- Родионов В.П., Г.С. Григор'єва, О.В. П'янкova, Н.Ф. Конахович. 2000. Особливості ефекту препарату Ліолив у терапії пігментного гепатозу у дітей // Фармакол. вісник. № 4. С.16–17.
- Фролов В.М., Г.С. Григор'єва, І.В. Лоскутова. 2000. Досвід і перспективи застосування нового препарату “Антраль” у клінічній практиці // Фармакол. Вісник. № 2. С.2–5.
- Albert A. 1989. Selective Toxicity. The physico-chemical basis of therapy. 7th ed. London - N.-Y.: Chapman and Hall. 2 vol.
- European Pharmacopeia. 1997. 3rd ed. Strasbourg: Council of Europe. 1800 p.
- Grigorieva G.S., N.F. Konakchovich, L.I. Budarin. 1986. Role of complexation in effective modification of therapeutic drugs // Abstr. Paper of XXIV ICCS. Athens, Greece. P.821.
- Iron and human disease. 1992. /Ed. R.B.Lauffer. Boca Raton: CRC Press. 534 p.
- Lasic D.D. 1993. Liposomes: From physics to application. Amsterdam-London-N.-Y.- Tokyo: Elsevier. 575 p.