

УДК 615.849 (57.043)

**Изменение показателей периферической крови и
цитогенетических показателей при применении
соединений медь-органических комплексов:
[Cu(PTA)₄]BF₄ и [Cu(PCN)(HBP₂₃)]BF₄ до облучения**

**А.М. Даллакян, Ж.Г. Петросян, Н.К. Арутюнян,
А.Г. Карапетян**

*Научный центр радиационной медицины и ожогов
0054, Ереван, Давидашен, п/я 25*

Ключевые слова: облучение, радиопротекторные соединения, пролиферативная активность, хромосомные aberrации, плоидность клеток, количество эритроцитов, лейкоцитов, уровень гемоглобина

Одной из приоритетных задач современной радиобиологии является поиск новых эффективных радиозащитных соединений. Радиопротекторы различают по эффективности и длительности защитного действия. Вещества с радиозащитными свойствами, обладающие кратковременным действием (в пределах нескольких минут или часов), предназначены для однократной защиты от острого внешнего облучения, а радиопротекторы длительного воздействия – для более продолжительного повышения радиорезистентности организма. Требования, предъявляемые к радиопротекторам, должны отвечать целям и задачам использования этих средств. Согласно Саксонову и соавт. [2], эти требования следующие: препарат должен быть достаточно эффективным и не вызывать выраженных побочных реакций; действовать быстро и сравнительно продолжительно; должен быть нетоксичным с терапевтическим коэффициентом не менее 3; не должен оказывать даже кратковременного отрицательного влияния на организм; иметь удобную лекарственную форму для перорального введения или инъекции; не должен снижать резистентность организма к другим неблагоприятным факторам внешней среды; препарат должен быть устойчивым при хранении, сохранять свои защитные и фармакологические свойства не менее 3 лет.

В этой области особый интерес представляют металл-органические комплексы, обладающие высокой антиоксидантной активностью. Согласно литературным источникам [3,4,10,11] и нашим ранним исследованиям [1,5–9], подобные комплексы обладают низкой токсичностью и выраженными радиозащитными свойствами.

Материал и методы

С целью выявления возможного радиозащитного действия нами были исследованы соединения медь-органических комплексов: $[\text{Cu}(\text{PTA})_4]\text{BF}_4$ и $[\text{Cu}(\text{PCN})(\text{HBP}_{23})]\text{BF}_4$, где лигандами являются: ПТА-1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane и PCN-tris(cyanoethyl)phosphine HBP_{23} -trispyrazolilborato (ПТА и PCN), синтезированные в Университете города Камерино (Италия) под руководством профессора Карло Сантини.

Эксперименты проводились на половозрелых, белых, беспородных крысах средней массой 180-200г. За час до общего, однократного рентгеноблучения животных дозами ЛД50/30 – 5,3Гр и ЛД100/30 – 7,0Гр на аппарате РУМ-17 в/б им вводились Cu-органические комплексы ПТА и PCN дозой 20мг/кг в виде водной суспензии. Радиопротекторная активность этих соединений оценивалась по выживаемости и средней продолжительности жизни, показывающей динамику гибели подопытных крыс в течение 30-дневного мониторинга.

Так как ионизирующее излучение является существенным повреждающим фактором цитогенетического статуса организма, нами анализировался радиационно-индуцированный кластогенез клеток костного мозга (ККМ), как один из самых информативных показателей. Использовалась общепринятая методика цитогенетического анализа показателей ККМ белых крыс (Макгрегор Г., 1976). Учитывались пролиферативная активность (митотический индекс – МИ), хромосомные aberrации (ХА), плоидность клеток. Также проводился гематологический анализ периферической крови: подсчет эритроцитов, лейкоцитов, уровень гемоглобина.

Эксперименты по выживаемости ставились на 60 крысах, по 10 особей на группу: чистое облучение дозой 5,3Гр и 7,0Гр (2группы контроля); ПТА+облучение дозой 5,3Гр и 7,0Гр (2группы) и PCN+облучение дозой 5,3Гр и 7,0Гр (2группы). Результаты сравнивались также с группой необлученных крыс (интактная группа).

У 40 особей был произведен забор биоматериала: костный мозг из бедренной кости и периферическая кровь из хвостовой вены.

Статистическая обработка цифрового материала проводилась с помощью ряда компьютерных программ. Были использованы электронная таблица Microsoft Excel и специализированные статистические пакеты Statsoft, SPSS и StatGraphics Plus.

Результаты и обсуждение

Определение выживаемости и средней продолжительности жизни показало, что у облученных крыс, которым вводились комплексы ПТА и PCN, эти показатели были выше, чем у животных из контрольной группы

(только облученных), что свидетельствует о радиозащитных свойствах испытуемых комплексов (табл. 1).

Был проведен также анализ выживаемости с помощью регрессионного метода, который дает возможность не только описывать динамику изменений показателей, но и возможность прогноза. Были получены формулы экспоненциальной регрессии по выживаемости соответственно: у контрольной группы (чистого облучения- Y_1 дозой 5,3Гр) и групп животных после введения РТА- и PCN-комплексов (20мг/кг) $Y_1=10.96e^{(-0.0237x)}$; $РТА_1=9.852e^{(-0.009x)}$; $PCN_1=10.26e^{(-0.0105x)}$, где x – количество дней после облучения (рис.1,а). Были получены также регрессионные кривые и соответствующие им уравнения, описывающие выживаемость групп животных, облученных дозой 7,0Гр (рис.1,б): $Y_2=8.9288e^{(-0.0483x)}$; $РТА_2=10.49e^{(-0.0181x)}$; $PCN_2=10.85e^{(-0.0197x)}$, где x – количество дней после облучения.

Таблица 1

Выживаемость и средняя продолжительность жизни крыс

Показатели	Выживаемость в %		Средняя продолжительность жизни в днях	
	5,3Гр	7,0Гр	5,3Гр	7,0Гр
Контроль	60	30	19,4	14,3
РТА+обл.	80	60	26,8	25
PCN+обл.	80	60	27,3	25,9

Выживаемость на 30-е сутки и при дозе облучения 5,3Гр, и при 7,0Гр равна 60%, что значительно выше выживаемости при чистом облучении (что свидетельствует о радиозащитных свойствах испытуемых комплексов), но кривые и уравнения экспоненциальной регрессии дают возможность аппроксимируя судить и о большей эффективности и продолжительности действия РТА относительно PCN.

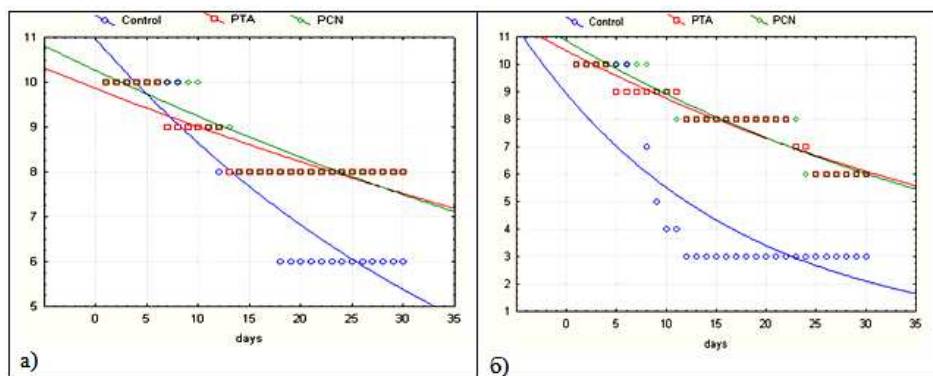


Рис. 1. Результаты регрессионного анализа выживаемости при 5,3Гр(а) и 7,0Гр(б)

Цитогенетический анализ проводили на 3-и сутки (когда происходит пик повреждений кариотипа, что связано с аддитивным эффектом прямого и косвенного воздействия лучевого фактора) и 30-е сутки после лучевого воздействия. Первый срок анализа цитогенетических параметров показал, что обе дозы облучения вызывают костномозговой синдром: радиационный блок митозов и репродуктивную гибель ККМ, приводящие к опустошению костного мозга (рис.2, а). Этот синдром сильнее выражен при дозе 7,0Гр. При сравнении МИ групп, получивших Си-содержащие комплексы, с контрольными группами (только облученными) отмечаются статистически значимо более высокие уровни пролиферации (табл. 2).

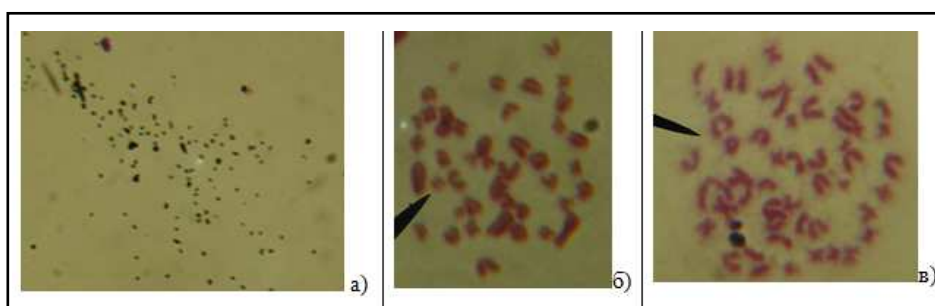


Рис. 2. Гибель клеток в форме кариорексиса (а). Хромосомные aberrации в виде двойного фрагмента (б) и ацентрического кольца (в)

Анализ кариотипа показал, что хромосомные aberrации в виде фрагментов, ацентрических колец и транслокаций (рис. 2,б,в), во всех группах исследования при обеих дозах облучения, достоверно превышают уровень aberrантности интактной группы ($3,0 \pm 0,22$). При сравнении этого показателя групп, получивших РТА и PCN, с группами контроля отмечается, что их aberrантность достоверно ниже уровня контрольных величин (табл. 2). Подсчет полиплоидных клеток (ППК), образующихся при ионизирующем облучении, как следствие эндомитоза, показал, что этот показатель во всех группах эксперимента превышает нулевой уровень интактной группы.

Таблица 2

Цитогенетические показатели на 3-и сутки после облучения

Показатели	Облучение 5,3Гр			Облучение 7,0Гр		
	контроль	РТА+обл.	PCN+обл.	контроль	РТА+обл.	PCN+обл.
МИ, %	$6,5 \pm 0,5$	$8,8 \pm 0,72^*$	$8,6 \pm 0,8^*$	$4,2 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,68^*$	$6,9 \pm 0,6^*$
ХА, %	$13,2 \pm 1,4$	$7,6 \pm 0,7^*$	$8,2 \pm 0,74^*$	$17,5 \pm 1,5$	$11,2 \pm 1,2^*$	$12,8 \pm 1,3^*$
ППК, %	$4,2 \pm 0,38$	$3,8 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,36$	$6,4 \pm 0,6$	$6,0 \pm 0,62$	$5,9 \pm 0,47$

Примечание. Здесь и в табл. 3,4 * статистически достоверные отклонения показателей от контроля, $p < 0,05$

Анализ цитогенетических показателей на 30-е сутки эксперимента показал, что в контрольных группах (чистое облучение в дозах 5,3 и 7,0Гр), ранее отмеченное угнетение пролиферативной активности несколько снижается (табл. 3).

В отличие от контрольных групп, в группах с предварительно введенными комплексами РТА и РСН значения МИ близки к норме ($20,1 \pm 2,8$). Сравнение пролиферативной активности групп РТА и РСН с группами контроля показало, что их значения достоверно выше контрольных.

Сравнительный анализ между контрольными группами и группами с введенными комплексами показал, что независимо от доз облучения отмечалось достоверно значимое понижение уровня аберрантных клеток. Так же, как и при раннем сроке наблюдения, число полиплоидов во всех группах эксперимента превышало нулевой уровень интактной группы. Этот показатель при дозе облучения 5,3Гр в группах РТА и РСН несколько ниже контрольного значения. При дозе облучения 7,0Гр в обеих группах с комплексами он достоверно ниже по сравнению с контролем.

Таблица 3

Цитогенетические показатели на 30-е сутки после воздействия

Показатели	Облучение 5,3Гр			Облучение 7,0Гр		
	контроль	РТА+обл.	РСН+обл.	контроль	РТА+обл.	РСН+обл.
МИ, %	$10,2 \pm 1,2$	$16,8 \pm 1,48^*$	$17,4 \pm 1,42^*$	$8,4 \pm 0,74$	$15,5 \pm 1,2^*$	$16,3 \pm 1,4^*$
ХА, %	$7,2 \pm 0,64$	$4,8 \pm 0,5^*$	$5,0 \pm 0,4^*$	$12,2 \pm 1,2$	$7,1 \pm 0,53^*$	$6,9 \pm 0,5^*$
ППК, %	$3,2 \pm 0,34$	$2,8 \pm 0,22$	$2,6 \pm 0,22$	$4,6 \pm 0,38$	$3,0 \pm 0,24^*$	$3,2 \pm 0,27^*$

Гематологические показатели (количество эритроцитов, лейкоцитов и уровень гемоглобина) анализировались в динамике в течение всего срока эксперимента. Высокая радиопоражаемость ККМ, приводящая к угнетению гемопоэза и гибели форменных элементов крови в самом кровеносном русле, причина выраженной эритро- и лейкопении и анемии. Эти 3 показателя в ранние сроки (3-и и 7-е сутки) исследования были достоверно ниже величин, соответствующих норме. На последних сроках наблюдения (14-е и 30-е сутки) отмечалось повышение числа эритроцитов и коррелированно с ним уровня гемоглобина.

Для описания динамики изменений уровней эритроцитов и гемоглобина был применен метод регрессионного анализа, который позволил прогнозировать дальнейшие изменения этих показателей.

Были получены уравнения логарифмической регрессии по изменению уровня эритроцитов соответственно: у контрольной группы (чистого облучения $-Y_1$ дозой 5,3Гр) и групп животных после введения РТА- и РСН-комплексов (20мг/кг) (рис.3,а): $Y_1 = 3.19 + 1.41 \lg(x)$; $РТА_1 = 3.38 +$

$1.89\lg(x)$; $PCN_1=3.317+1.88\lg(x)$. Были получены также регрессионные кривые и соответствующие им уравнения, описывающие изменение уровня эритроцитов у животных, облученных дозой 7,0Гр (рис. 3,б): $Y_2=2.21+1.52\lg(x)$; $PTA_2=2.35+2.09\lg(x)$; $PCN_2=2.25+2.13\lg(x)$. Во всех уравнениях, описывающих динамику изменения уровня эритроцитов (рис.3, а,б), x – количество дней после облучения.

Были получены уравнения логарифмической регрессии по изменению уровня гемоглобина: у контрольной группы (чистого облучения – Y_3 дозой 5,3Гр) и групп животных после введения РТА- и PCN-комплексов (20мг/кг) (рис.3,в): $Y_3=66.92+44.94\lg(x)$; $PTA_3=93.13+40.52\lg(x)$; $PCN_3=92.18+40.75\lg(x)$. Были получены также регрессионные кривые и соответствующие им уравнения, описывающие изменение уровня гемоглобина у животных, облученных дозой 7,0Гр (рис. 3,г): $Y_4=62,45+37,53\lg(x)$; $PTA_4=68.92+47.13\lg(x)$; $PCN_4=68.85+45.75\lg(x)$. Во всех уравнениях, описывающих динамику изменения уровня гемоглобина (рис.3, в,г), x – количество дней после облучения.

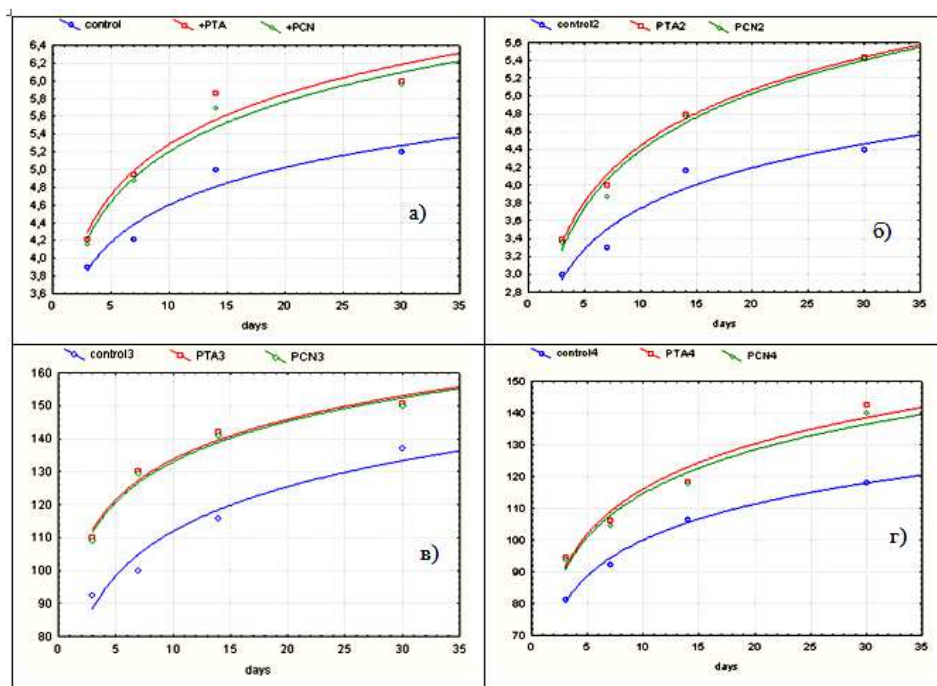


Рис. 3. Динамика изменения уровней эритроцитов (а,б) и гемоглобина (в,г) на 3,7,14 и 30-е сутки и соответствующие им кривые логарифмической регрессии

Согласно кривым и уравнениям логарифмической регрессии, скорость восстановления уровней этих показателей в группах с введенными комплексами в 1,2-1,5 раза выше, чем у облученных, и тенденция к повы-

шению уровней эритроцитов и гемоглобина сохранится еще 15-30 дней до полной нормализации.

При сравнении групп с введенными РТА- и PCN-комплексами и контрольными группами (с облучением в 5,3 и 7,0 Гр) отмечалось статистически достоверное повышение числа лейкоцитов на 14-е и 30-е сутки (табл.4).

Таблица 4

Динамика изменения уровня лейкоцитов

Срок в сутках	Облучение 5,3Гр			Облучение 7,0Гр		
	контроль	РТА+обл.	PCN+обл.	контроль	РТА+обл.	PCN+обл.
3	0,45±0,05	0,5±0,06	0,52±0,05	0,29±0,026	0,32±0,04	0,3±0,032
7	0,9±0,07	1,24±0,22	1,28±0,14	0,5±0,04	0,78±0,08*	0,76±0,06*
14	2,2±0,3	3,7±0,36*	3,58±0,33*	1,6±0,15	2,85±0,26*	2,9±0,3*
30	4,8±0,4	6,2±0,54*	6,0±0,52*	3,5±0,34	5,2±0,5*	5,22±0,53*

Таким образом, основываясь на результатах выживаемости, средней продолжительности жизни, цитогенетики и гематологии, можно заключить, что исследуемые комплексы проявляют ощутимые радиозащитные свойства. Оба комплекса показали по всем наблюдаемым критериям идентичность воздействия на подопытных животных.

В фазу разгара, в ранние сроки анализов (3-и и 7-е сутки), оба соединения смягчают поражающее действие облучения при обеих дозах, проявляющееся достоверными сдвигами митотического индекса и ХА по сравнению с контрольными данными. На последних сроках наблюдения (14-е и 30-е сутки) многие значения показателей (МИ, показатели красной крови) приблизились к данным нормы, ХА и число лейкоцитов при сравнении с данными контроля статистически достоверно отличаются. С помощью регрессионных уравнений и кривых описаны изменения выживаемости, количества эритроцитов и гемоглобина, что дает возможность прогнозировать, точно рассчитать сроки нормализации показателей и определить эффективность и продолжительность действия исследуемых комплексов.

На основании полученных результатов можно считать, что исследуемые Си-лиганды эффективно способствуют репаративным процессам в костномозговых клетках и обладают свойствами выраженных радиомодификаторов.

Поступила 31.01.19

**Պերիֆերիկ արյան և բջջագենետիկական ցուցանիշների
փոփոխությունները $[Cu(PTA)_4]BF_4$ և $[Cu(PCN)(HBP_{23})]BF_4$
պղինձ-օրգանական կոմպլեքսների միացությունների
կիրառման դեպքում ճառագայթահարումից առաջ**

**Ա.Մ. Դավաթյան, Ժ.Հ. Պետրոսյան, Ն.Կ. Հարությունյան,
Ա.Գ. Կարապետյան**

Ժամանակակից ռադիոկենսաբանության արդի խնդիրներից է նոր արդյունավետ ռադիոպաշտպանիչ միացությունների որոնումը: Այդ ոլորտում հատուկ հետաքրքրություն են ներկայացնում մետաղ-օրգանական կոմպլեքսները: Մեր կենտրոնում հետազոտվել են պղինձ-օրգանական կոմպլեքսներ $[Cu(PTA)_4]BF_4$ -ի և $[Cu(PCN)(HBP_{23})]BF_4$ -ի հատկությունները, որտեղ լիգանտներ են՝ PTA-1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane և PCN-tris(cyanoethyl)phosphine HBP₂₃-trispyrazolilborato, որոնք սինթեզվել են Կամերինո քաղաքի համալսարանում:

Փորձերը կատարվել են սպիտակ, անցեղ առնետների վրա: Կատարվել է ներորովայնային ներարկում 20մգ/կգ չափաբաժնով սուսպենզիայի տեսքով՝ 5,3Գր կամ 7,0Գր դոզաներով ընդհանուր միանվագ ռենտգենյան ճառագայթումից 1 ժամ առաջ: Այս միացությունների ռադիոպաշտպանիչ ակտիվությունը գնահատվել է առնետների ապրելունակության, կյանքի միջին տևողության, պրոլիֆերատիվ ակտիվության, քրոմոսոմների արերացիաների, կարիոտիպի պլոիդության, էրիթրոցիտների, լեյկոցիտների, հեմոգլոբինի քանակի դինամիկայի տվյալների հիման վրա:

Հիմնվելով ապրելունակության, կյանքի միջին տևողության բջջագենետիկական և արյունաբանական արդյունքների վրա՝ կարելի է եզրակացնել, որ ուսումնասիրվող կոմպլեքսները ցուցաբերում են զգալի ռադիոպաշտպանիչ հատկություններ: Վաղ շրջանում (3-րդ և 7-րդ օրեր) 2 միացություններն էլ մեղմացնում են ճառագայթահարման ազդեցությունը 2 դոզաների դեպքում: Դիտարկման վերջին օրերին (14-րդ և 30-րդ օրեր) անալիզների տվյալների մեծամասնությունը (ՄԻ, կարմիր արյան ցուցանիշներ) մոտենում է նորմայի տվյալներին, իսկ քրոմոսոմային արերացիաները և լեյկոցիտների քանակը, համեմատած ստուգիչ խմբի տվյալների հետ, տարբերվում են: Ռեգրեսիոն բանաձևերի և կորերի միջոցով նկարագրվել է ապրելունակության, էրիթրոցիտների և հեմոգլոբինի փոփոխությունների դինամիկան, ինչը հնարավորություն է ընձեռել իրագործելու կանխատեսում, ստանալու ցուցանիշների նորմալիզացման ստույգ ժամանակահատվածը և գտնե-

լու հետազոտվող կոմպլեքսների ազդեցության տևողությունը և արդյունավետությունը:

Հիմնվելով ստացված արդյունքների վրա՝ կարող ենք եզրակացնել, որ ուսումնասիրված Cu լիգանտները նպաստում են բջիջներում ռեպարատիվ պրոցեսներին և ցուցաբերում են արտահայտված ռադիոմոդիֆիկատորների հատկություններ:

Changes in Peripheral Blood Indicators and Cytogenetic Indicators When Using Copy Organic Complex Compounds: [Cu (PTA)₄] BF₄ and [Cu (PCN) (HBP₂₃)] BF₄ before Radiation

A.M. Dallakyan, J.H. Petrosyan, N.K. Harutyunyan, A.G. Karapetyan

One of the priority tasks of modern radiobiology is the search of new effective radioprotective compounds. Special interest causes metal-organic complexes. In order to identify possible radioprotective effects, we investigated compounds of copper-organic complexes: [Cu (PTA)₄] BF₄ and [Cu (PCN) (HBP₂₃)] BF₄, where the ligands are: PTA-1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane and PCN-tris (cyanoethyl) phosphine HBP₂₃-trispyrazolilborato (hereinafter referred to as PTA and PCN), synthesized at the University of Camerino.

Experiments were conducted on white, purebred rats. An hour before the total, single X-ray irradiation with doses of 5.3Gy or 7.0Gy, animals were injected with Cu-organic complexes PTA and PNC with a dose of 20 mg/kg in the form of an aqueous suspension. The radioprotective activity of these compounds was assessed by survival, life expectancy, clastogenesis of bone marrow cells, mitotic index, chromosomal aberrations, and cell ploidy. Hematological analysis of peripheral blood was also carried out: counting of erythrocytes, leukocytes, hemoglobin level.

Based on the results of survival, life expectancy, cytogenetic and hematological parameters, it can be concluded that the studied complexes exhibit pronounced radioprotective properties. In the early stages (days 3 and 7), both compounds soften the damaging effects of radiation at both doses. In the last periods of observation (the 14th and 30th days), many values of the indicators (mitotic index, red blood counts) approached the data of the norm. When compared with the control group data, chromosomal aberrations and number of leukocytes is significantly different. Using regression equations and curves, changes in the survival rate, the number of erythrocytes and hemoglobin are described, which makes possible to predict, accurately calculate the timeline for the normalization of indicators and determine the effectiveness and duration of action of the studied complexes.

On the basis of the obtained results, it can be assumed that the studied Cu ligands effectively contribute to reparative processes in bone marrow cells and have the properties of pronounced radiomodifiers.

Литература

1. Баджиян С.А., Малакян М.Г., Егиазарян Д.Э., Даллакян А.М., Вардеванян Л.А. Сравнительное изучение радиозащитной активности комплексов меди с шиффовыми основаниями, производными L-тирозин и L- фенилаланина. Актуальные проблемы радиационной безопасности, Ереван, 2014, с.61-64.
2. Саксонов П.П. Шапков В.С., Сергеев П.В. Радиационная фармакология, М.,1976.
3. Bhirud R. G., Srivastava T. S. Superoxide dismutase activity of $\text{Cu(II)}_2(\text{aspirinate})_4$ and its adducts with nitrogen and oxygen donors. *Inorganica Chimica Acta*, 1990, v.173, (1), 121-125.
4. John R.J., Sorenson Lee S.F., Soderberg and Louis W. Chang Radiation Protection and Radiation Recovery with Essential Metalloelement Chelates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1995 , 210:191-204.
5. Malakyan M., Pogosyan A., Dallakyan A., Yegiazaryan D., Bajinyan S. Radioprotective properties and cytogenetic activity of $\text{Cu(II)(Ni continyl-L- Tyrosinate)}_2$ in X-ray irradiated rats. 38-th Ann. Meeting of European Research Society Abstracts, Stockholm, 5-9 September, 2010, p.141.
6. Malakyan M., Bajinyan S., Martirosyan V., Tonoyan V., Babayan K., Tadevosyan D., Yegiazaryan D., Pogosyan A., Dallakyan A. et al. Synthesis and radioprotective properties of cooper complexes of Schiff bases derived from L-histidine and pyridinecarboxaldehyde. International Conference Radiation Safety challenges in the 20-th Century Proceedings, Yerevan, 2012, p.57-60.
7. Malakyan M., Dallakyan A., Bajinyan S., Tonoyan V., Ayvazyan V., Karapetyan N. Development of Potential Radioprotective Agents For USE in Field Exposure Situations. "BRIte" Biomarkers of Radiation in the Environment: Robust tools for risk assessment", Yerevan, Armenia, 2017, p.22.
8. Poghosyan A.S., Dallakyan A.M. Cytogenetic Consequence of radiation "Ageing" of organism. NIRS-IAEA Workshop on Cytogenetic Biodosimetry for Asia incorporation with WHO 2011, p.420.
9. Pogosyan A.S., Dallakyan A.M., Karapetyan A.G., Hovhannesyan A.N. Role and probable mechanisms of polyploidy cells formation in irradiated organism. International Conference Radiation Safety challenges in the 21st Century. Proceedings, Yerevan, 2012, p.85-86.
10. Riley D.P. Functional mimics of superoxide dismutase enzymes as therapeutic agents, *Chem. Rev.* 1999 (99), 2573–2588.
11. Salvemini D., Riley D.P., Cuzzocrea S. SOD mimetics are coming of age. *Nat. Rev. Drug Discover.* 1. 2002, 367–374.