

CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

**CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS E PRÁTICAS SOBRE A DEGRADAÇÃO
DE RADIOTRAÇADORES MOLECULARES: FORMULAÇÃO DE
MODELO MATEMÁTICO - APLICAÇÃO À DEGRADAÇÃO
DA RADIOINSULINA - 125I.**

Carlos Henrique de Mesquita e Margarida Mizue Hamada

PUBLICAÇÃO IPEN 125

SETEMBRO/1987

SÃO PAULO

**CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS E PRÁTICAS SOBRE A DEGRADAÇÃO
DE RADIOTRAÇADORES MOLECULARES: FORMULAÇÃO DE
MODELO MATEMÁTICO - APLICAÇÃO À DEGRADAÇÃO
DA RADIOINSULINA - ^{125}I .**

Carlos Henrique de Mesquita e Margarida Mizue Hamada

DEPARTAMENTO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

iNIS Categories and Descriptors

C 62.00

F 51.00

INSULIN

IODINE 125

LABELLED COMPOUNDS

DECOMPOSITION

MATHEMATICAL MODELS

CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS E PRÁTICAS SOBRE A DEGRADAÇÃO DE RADIOTRAÇADORES MOLECULARES: FORMULAÇÃO DE MODELO MATEMÁTICO - APLICAÇÃO À DEGRADAÇÃO DA RAIINSULINA - ^{125}I .

Carlos Henrique de Mesquita e Margarida Mizue Hamada

RESUMO

Formulou-se um modelo matemático para descrever a cinética de degradação de traçadores moleculares radioativos utilizados nos radioensaios. Para a formulação deste modelo foram considerados quatro parâmetros: 1) um parâmetro associado a constante de desintegração do radionuclídeo, 2) a constante " k_p " de degradação independente da radiodesintegração, 3) a constante " k " da degradação química da molécula na sua forma natural e 4) a fração " f_p " na amostra das moléculas marcadas. Levando-se em conta os valores que estes quatro parâmetros podem assumir, foram analisados dez casos. Para enquadrar os dados experimentais a um dos dez casos é necessário determinar a concentração em diferentes tempos da amostra radioativa, de uma amostra fria simuladora (proveniente de uma falsa marcação) e de amostra fria controle.

A fim de ilustrar a aplicação deste modelo utilizou-se a radioinsulina marcada com ^{125}I . Esta amostra degradou-se com taxa diária de 0,45% e a fração das moléculas marcadas com o ^{125}I foi de 72%.

MATHEMATICAL MODEL APPLIED TO DECOMPOSITION RATE OF RIA RADIOTRACERS: ^{125}I INSULIN USED AS SAMPLE MODEL

ABSTRACT

A mathematical model is described to fit the decomposition rate of labelled RIA compounds. The model was formulated by using no more than four parameters: 1) one parameter correlated with the radioactive decay constant, 2) the chemical decomposition rate " k_p " of the radiolabelled molecules, 3) the natural chemical decomposition rate " k " and 4) the fraction " f_p " of the labelled molecules in the substrate.

According to the particular values that these parameters can assume ten cases were discussed. To determine one of these cases which fit the experimental data we need three types of samples: a) radioactive, b) simulated radiotracer ("false radiolabelled") and c) non-labelled common substrate.

The radioinsulin ^{125}I was used as an example to illustrate the model application. The experimental data substantiate that the insulin labelled according to the substoichiometric procedures and kepted at freezer temperature were degraded with $k = 0,45\%$ per day. It was not observed any evidence that the ^{125}I added in molecule contribute with the immunodegradation process.

I – INTRODUÇÃO

O conhecimento dos parâmetros da degradação de radiotraçadores moleculares é útil para estabelecer a sua pureza, radioatividade específica⁽²⁾ e seu prazo de validade⁽⁸⁾.

A aplicação de modelos matemáticos no estudo da degradação dos radiotraçadores moleculares e pouco comum na literatura do radioimunoensaio, apesar de toda a importância desta metodologia na atualidade. O trabalho mais expressivo neste campo é descrito por Cooper e Durke⁽²⁾, entretanto é limitado aos casos em que a radiodesintegração resulta sempre numa efetiva alteração ou destruição da molécula marcada e só esse efeito é levado em conta. No presente estudo considera-se outros fatores de natureza química que atuam no processo de degradação da molécula.

Com o objetivo de contribuir nesse campo foi descrito um modelo matemático útil para explicar o comportamento cinético de degradação de radiotraçadores moleculares, utilizados na metodologia dos radioensaios⁽⁵⁾.

Na formulação desse modelo foram considerados quatro parâmetros, a saber:

- a) um parâmetro α associado à constante de desintegração do radionuclídeo, o qual assume os valores discretos de 0 ou 1.
- b) a constante de degradação não dependente da radiodesintegração, designada por " k^* " (tempo^{-1})
- c) a constante da degradação química da molécula na sua forma natural, designada por " k " (tempo^{-1}) e
- d) a fração das moléculas marcadas, denominada de f^*

A utilização de apenas esses quatro parâmetros reúne as características de atender com objetividade e simplicidade a análise cinética da degradação da amostra radioativa.

Para ilustrar a sistemática experimental e o desenvolvimento da conduta racional que leva a análise dos resultados, utilizou-se dados experimentais da degradação da ^{125}I -insulina.

II – MODELO MATEMÁTICO

Na formulação do modelo procurou-se alcançar simplicidade algébrica e consistência com a realidade. As premissas básicas adotadas na formulação do modelo foram as seguintes:

- a) Há moléculas que perdem completamente a sua capacidade reativa quando ocorre a desintegração do radiotraçador, por exemplo, a triiodotironina (T_3) marcada com iodo radioativo que pode se transformar em diiodotironina (T_2) e não reagir mais com o anticorpo, anti- T_3 .
- b) Há moléculas que não perdem a sua capacidade reativa no processo da radiodesintegração. Neste caso incluem-se aquelas moléculas complexas, nas quais a perda do elemento radioativo pouco ou nada interfere no seu conjunto.
- c) Supõem-se que as espécies moleculares radioativas devem se enquadrar entre uma das duas premissas acima, "a" ou "b", isto é, a perda da capacidade reativa com o evento da radiodesintegração tem carácter discreto: perde ou não a capacidade reativa, não admitindo-se graduação da perda de capacidade reativa pelo processo da radiólise.

- d) O número de átomos radioativos em cada molécula deve ser no máximo igual a um.
- e) O processo de desativação imunológica (ou degradação) da molécula obedece a uma reação monomolecular irreversível, cineticamente de primeira ordem.
- f) A radiólise na fração não marcada é desprezível.
- g) As moléculas frias (não marcadas) e marcadas com o radiotraçador tem o mesmo comportamento químico.

O termo "degradação" utilizado neste trabalho tem o sentido restrito à expressão perda da capacidade reativa. No campo dos radioensaios uma molécula (antígeno) pode se transformar quimicamente após a radiodesintegração ou por outros processos sem afetar o seu sítio ativo. Deste modo essas transformações poderão não interferir na reação antígeno-anticorpo.

DEDUÇÃO DO MODELO ANALÍTICO

Seja uma amostra radioativa contida por uma fração " f_m " de moléculas P_m marcadas e outra parcela $(1 - f_m)$ de moléculas P frias i.e., não marcadas com o radioisótopo.

Supomos que o esquema da reação que leva a degradação dessas moléculas siga as equações seguintes:



Moléculas ativas	Produtos inativos
---------------------	----------------------

Sendo (P) e (P^*) as respectivas concentrações das moléculas ativas, então de acordo com a reação cinética de primeira ordem, i.e., a velocidade da reação depende diretamente da concentração do reagente, podemos equacionar:

$$\frac{d[P]}{dt} = -k[P] \quad (3)$$

$$\frac{d[P^*]}{dt} = -k^*[P^*] - \alpha\lambda[P^*] \quad (4)$$

onde k e k^* são as constantes de velocidade de degradação de natureza química, enquanto a constante λ reflete a velocidade de desintegração radioativa do radiotraçador utilizado ($\lambda_{^{125}\text{I}} = 8,02 \times 10^{-5}$, $\lambda_{^{131}\text{I}} = 6,02 \times 10^{-5}$ e $\lambda_{^3\text{H}} = 1,08 \times 10^{-7}$). O parâmetro α tem aqui um carácter discreto, isto é, assume o valor $\alpha = 0$ ou $\alpha = 1$ de acordo com as premissas "a" ou "b" e "c" enunciadas anteriormente.

A solução das equações diferenciais (3) e (4) conduzem a:

$$[P] = [P]_0 e^{-kt} \quad (5) \text{ e}$$

$$[P^*] = [P^*]_0 e^{-(k_* + \alpha\lambda)t} \quad (6)$$

onde $[P]_0 = C_0$ e $[P^*]_0 = C_0^*$ representam as concentrações iniciais de P e P* na amostra.

De acordo com a premissa "g" os reagentes P e P* são idênticos quimicamente e portanto:

$$[P] + [P^*] = C(t) \quad (7)$$

e

$$[P]_0 + [P^*]_0 = C(0) \quad (8)$$

Associando as equações (5) a (8) temos:

$$C(t) = C_0 e^{-kt} + C_0^* e^{-(k_* + \alpha\lambda)t} \quad (9)$$

Mas,

$$\frac{C_0^*}{C_0 + C_0^*} = \frac{P^*_0}{P_0 + P^*_0} = f^* \quad (10) \text{ e}$$

$$\frac{C_0}{C_0 + C_0^*} = 1 - f_* \quad (11)$$

então dividindo os dois membros da equação (9) por $C_0 + C_0^*$, resulta:

$$\frac{C(t)}{C_0 + C_0^*} = \frac{C_0}{C_0 + C_0^*} e^{-kt} + \frac{C_0^*}{C_0 + C_0^*} e^{-(k_* + \alpha\lambda)t} \quad (12)$$

e conseqüentemente:

$$I(t) = (1 - f_*) e^{-kt} + f_* e^{-(k_* + \alpha\lambda)t} \quad (13)$$

$$\text{fazendo } I(t) = \frac{C(t)}{C(0)} = \frac{C(t)}{C_0 + C_0^*} \quad (14)$$

ou alternativamente

$$C(t) = C(0) [(1 - f_*) e^{-kt} + f_* e^{-(k_* + \alpha\lambda)t}] \quad (15)$$

As equações (13) ou (15) representam o modelo analítico utilizado neste trabalho para prever a degradação dos radiotraçadores usados nos radioensaios.

Como se infere da equação (13) a fração $I(t)$ depende de quatro parâmetros a saber: f_* , k , k_* e α .

A seguir descrevemos os procedimentos básicos para a determinação numérica desses parâmetros.

O analista deverá conhecer previamente:

- 1) a atividade específica "S" da amostra radioativa
- 2) a curva experimental da concentração C(t) ou I(t) da amostra radioativa, de uma amostra fria controle ou de uma amostra fria simuladora, esta submetida aos mesmos procedimentos da radiomarcção (comumente denominada "falsa marcação" onde se substitui o radioisótopo por elemento frio).

A atividade específica "S" pode ser experimentalmente determinada por meio do método do auto deslocamento. As referências bibliográficas de números 6, 7 e 9 descrevem sucintamente a determinação de "S".

O parâmetro "f_s" do modelo (13) ou (15) é estimado por uma das seguintes expressões:

$$f_s = 5,32 \times 10^{-12} \times S \times PM \times t_{1/2} \quad (16)$$

$$f_s = 3,69 \times 10^{-12} \times \frac{S \times PM}{\lambda} \quad (17)$$

onde:

S representa a atividade específica da amostra radioativa expressa em Ci/g

PM é o peso molecular em gramas

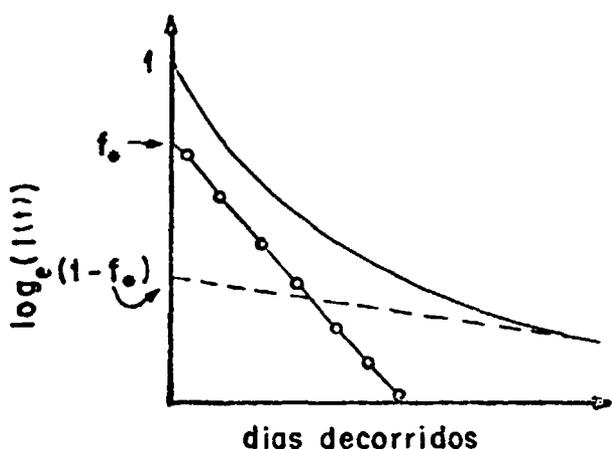
t_{1/2} é a meia vida física do radiotraçador expresso em minutos e

$\lambda = \frac{0,693}{t_{1/2}}$ é a constante de decaimento físico do radiotraçador.

A determinação da concentração química da amostra radioativa oferece maiores dificuldades técnicas pois geralmente encontra-se em níveis traços (concentrações muito baixas). Novamente, a técnica do autodeslocamento (6,7,9) é utilizada para esse fim. As curvas das amostras frias, controle e simuladora, são comumente obtidas por um radioensaio convencional ou qualquer outro método químico. Se o analista conhece o valor da constante "k" de degradação da amostra controle nas condições de ensaio não necessitará elaborar a curva desta amostra.

As curvas das concentrações das amostras, C(t) ou I(t), em função do tempo decorrido são plotadas em escala semi-logarítmica.

A representação gráfica da função (13) ou (15) corresponde à combinação de duas componentes monoexponenciais, conforme Figura 1.



$$k = \frac{0,693}{t_{1/2}}$$

$$(k_* + \alpha\lambda) = \frac{0,693}{t^*_{1/2}}$$

$t_{1/2} \rightarrow$ tempo na reta -.-.-.- correspondente ao valor $\frac{1 - f_*}{2}$

$t^*_{1/2} \rightarrow$ tempo na reta - - - - correspondente ao valor $\frac{f^*}{2}$

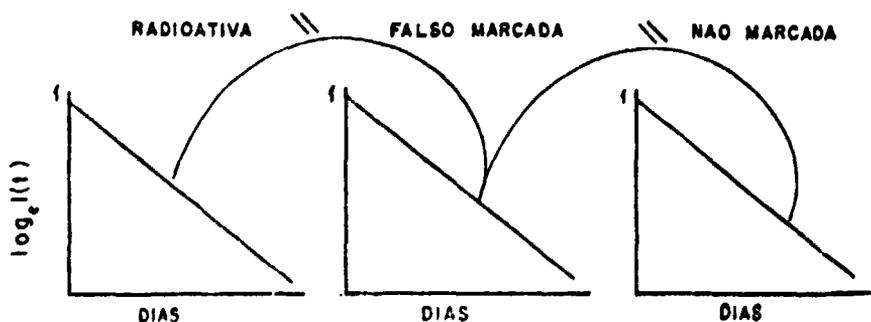
Figura 1 – Uma Representação Gráfica da Equação 13

A primeira tarefa do analista é elaborar a decomposição da curva experimental e calcular os valores de k , k^* , e $\alpha\lambda$. Para isto vários métodos podem ser utilizados, dos quais a decomposição gráfica ponto a ponto ("peeling")^(3,10) e a aplicação do método dos mínimos quadrados não linear^(3,10) são os mais aconselháveis.

Os quatro parâmetros experimentais do modelo proposto podem assumir valores especiais e como consequência, dez casos são considerados, os quais facilitam a análise dos dados. A seguir fazemos uma descrição desses dez casos. O esquema abaixo auxilia o entendimento dessa descrição.

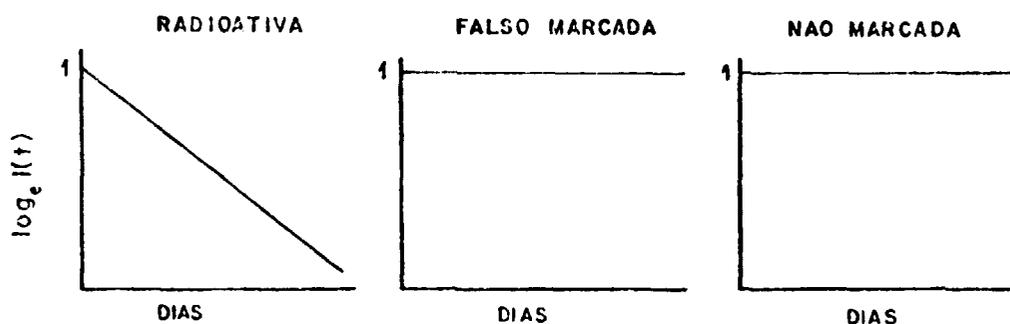
Caso 1 $f_* = 1$ $\alpha = 0$ $k^* = k > 0$ $I(t) = e^{-kt}$

- . A degradação é independente do processo de radiodesintegração
- . Ocorre perda da capacidade reativa por outros processos
- . As retas das amostras radioativa, simuladoras e fria são paralelas.



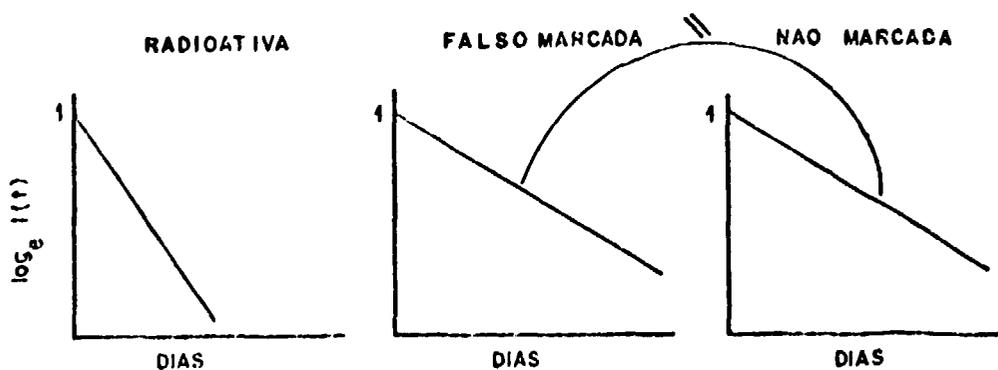
Caso 2 $f_* = 1$ $\alpha = 1$ $k^* = k = 0$ $I(T) = e^{-\alpha\lambda t}$

- A degradação é dependente da radiodesintegração
- Não ocorre degradação "química"
- O coeficiente angular da amostra radioativa coincide com a constante de desintegração física (λ) do elemento radioativo
- A concentração das outras duas amostras é constante.



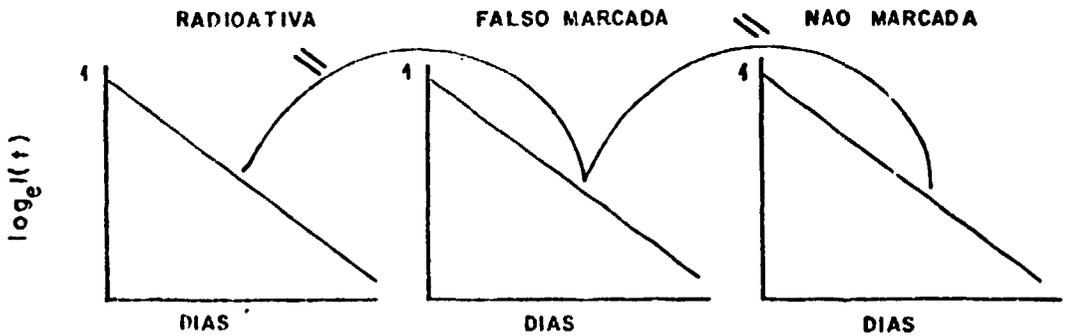
Caso 3 $f_* = 1$ $\alpha = 1$ $k_* = k > 0$ $I(t) = e^{-(k + \alpha\lambda)t}$

- A degradação é dependente do processo de desintegração
- Existe a componente de degradação "química"
- A inclinação da reta da amostra radioativa é maior do que as outras duas amostras
- As retas das amostras simuladora e fria são idênticas (paralelas)



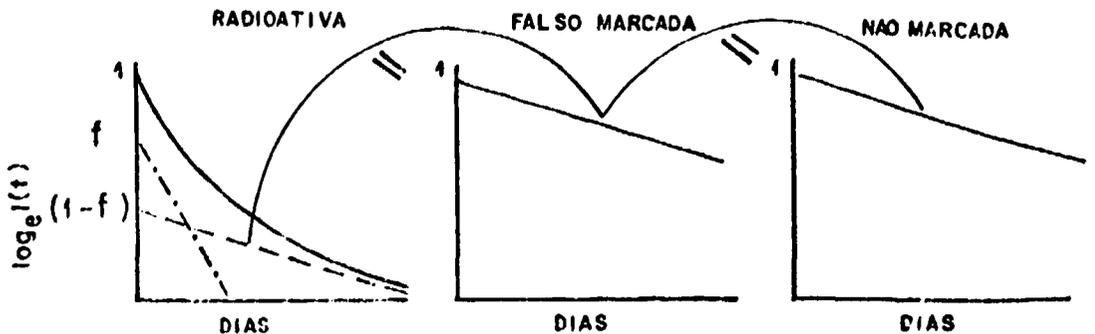
Caso 4 $f_* < 1$ $\alpha = 0$ $k = k_* > 0$ $I(t) = e^{-kt}$

- . A degradação não depende da radiodesintegração
- . Ocorre degradação "química" nas três amostras
- . As retas das três amostras são paralelas
- . Esse caso assemelha-se ao caso 1 e o critério de identificação é o fato de $f_* < 1$



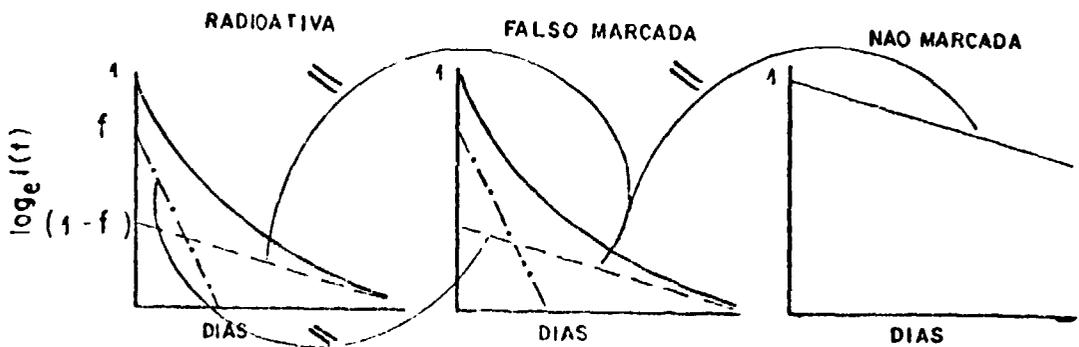
Caso 5 $f_* < 1$ $\alpha = 1$ $k = k_* > 0$ $I(t) = (1 - f_*)e^{-kt} + f_*e^{-(k + \alpha\lambda)t}$

- . A degradação depende da radiodesintegração
- . Ocorre degradação "química" nas três amostras
- . A função experimental da amostra radioativa é composta (curvas)
- . Nas três amostras um dos componentes são idênticos (paralelas)



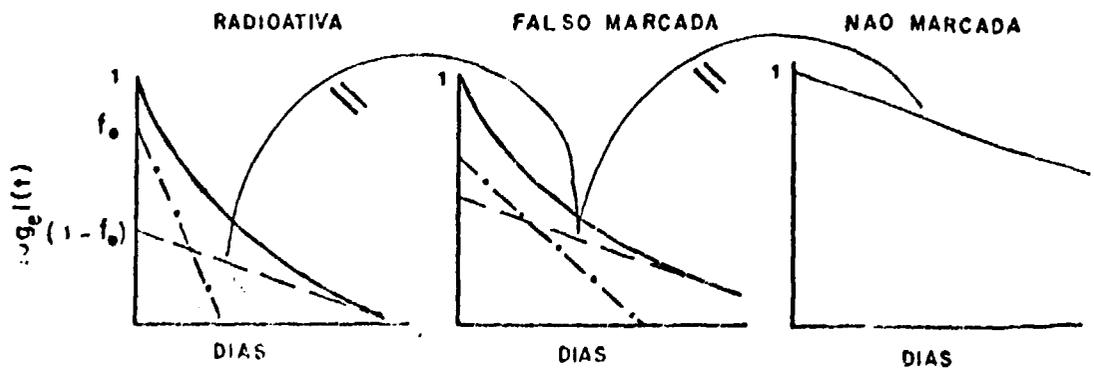
Caso 6 $f_* < 1$ $\alpha = 0$ $k > 0$ $k_* > 0$ $k \neq k_*$ $I(t) = (1 - f_*)e^{-kt} + f_*e^{-k_*t}$

- A degradação independe da radiodesintegração
- Ocorre degradação "química" nas três amostras
- A função experimental da amostra radioativa e simuladora são compostas e idênticas entre si
- Nas três amostras um dos componentes são idênticos (paralelas).



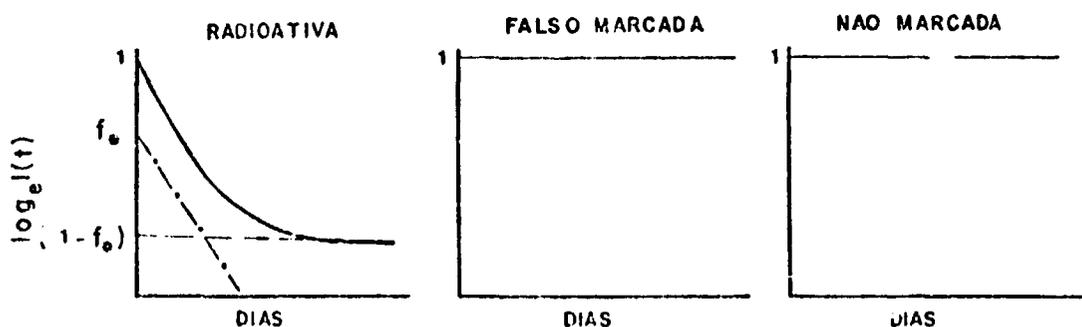
Caso 7 $f_* < 1$ $\alpha = 1$ $k > 0$ $k_* > 0$ $k \neq k_*$ $I(t) = (1 - f_*)e^{-kt} + f_*e^{-(k_* + \alpha\lambda)t}$

- A degradação é dependente da radiodesintegração
- Ocorre degradação "química"
- A função experimental da amostra radioativa e simuladora são compostas
- Nas três amostras ocorre paralelismo em um dos componentes
- Entre as amostras radioativa e simuladora uma das retas dos componentes não é paralela.



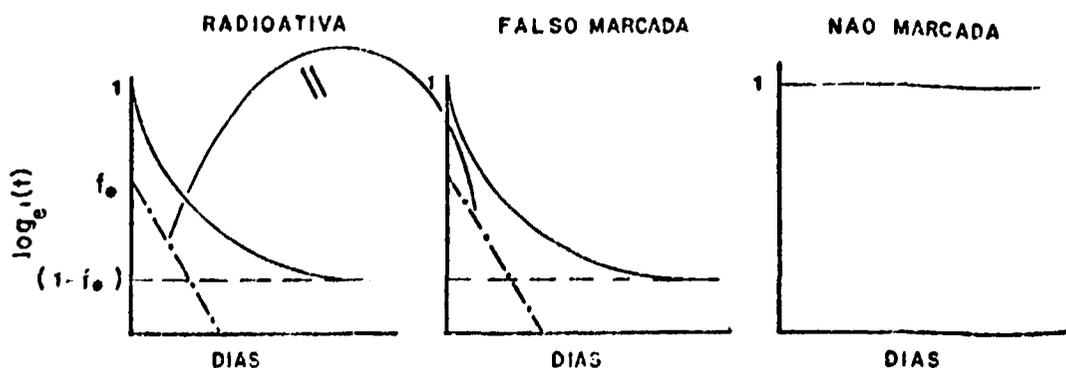
Caso 8 $f_* < 1$ $\alpha = 1$ $k = k_* = 0$ $I(t) = (1 - f_*) + f_* e^{-\alpha \lambda t}$

- . A degradação é dependente da radiodesintegração
- . Não ocorre degradação "química"
- . A função experimental da amostra radioativa é composta enquanto as amostras não radioativas não ocorre nenhuma degradação
- . Um dos componentes da amostra radioativa tem o coeficiente angular coincidente com o valor da constante de decaimento radioativo.



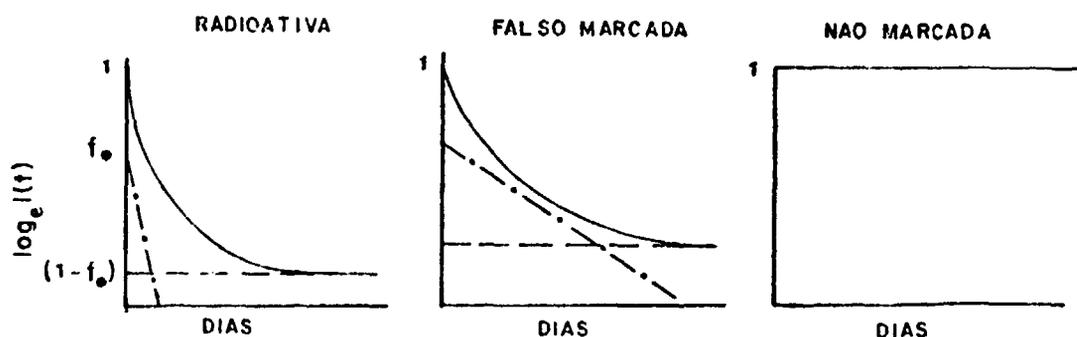
Caso 9 $f_* < 1$ $\alpha = 0$ $k = 0$ $k_* > 0$ $I(t) = (1 - f_*) + f_* e^{-k_* t}$

- . A degradação não depende da radiodesintegração
- . Ocorre degradação "química" somente nas amostras radioativa e simuladora
- . A função experimental da amostra radioativa é composta
- . As funções das amostras radioativa e simuladora são idênticas.



Caso 10 $f_* < 1$ $\alpha = 1$ $k = 0$ $k_* > 0$ $I(t) = (1 - f_*) + f_* e^{-(k_* + \alpha\lambda)t}$

- A degradação depende da radiodesintegração
- Ocorre degradação "química" somente nas amostras radioativa e simuladora
- A função experimental das amostras radioativas e simuladora são compostas e um dos componentes da degradação não são paralelos.



III – REAGENTES

A ^{125}I -insulina usada como traçador foi radiodiodada pelo método substequiométrico da Cloramina-T (E. Merck, Alemanha) descrito por Freychet e colaboradores⁽⁴⁾.

A atividade específica inicial foi de 260,48 Ci/g e nessas condições estima-se pela equação (16) que a fração de átomos de ^{125}I por molécula de insulina é de $f_* = 0,72$.

A insulina fria simuladora foi obtida mediante marcação falsa com NaI não radioativo, seguindo os mesmos procedimentos e nas mesmas condições utilizadas para a marcação verdadeira com ^{125}I .

Para avaliar o comportamento da integridade imunorreativa da ^{125}I -insulina no decorrer do tempo, prepararam-se três amostras em tampão veronal, sendo uma amostra radioativa, uma amostra fria simuladora e uma amostra fria controle. Determinou-se a concentração química destas amostras em diferentes dias utilizando-se o método do autodeslocamento descrito por Morris⁽⁹⁾ e fazendo-se o uso do radioensaio (RIA)⁽¹⁾.

Os controles de insulina usados como soluções padrões no RIA foram preparados no momento a partir de insulina cristalizada.

Decorridos 124 dias, nos quais foram realizados 13 ensaios, lançaram-se os valores das concentrações químicas das três amostras em gráfico com disposição semi-logarítmica.

A distribuição dos pares dos pontos experimentais (dia, concentração) mostrou-se regularmente linear (monoexponencial), conforme Figura 2.

O ajuste dos pontos experimentais à função exponencial foi efetuado pelo método dos mínimos quadrados^(3,10). Particularmente, não houve necessidade de decompor a curva experimental devido a sua linearidade.

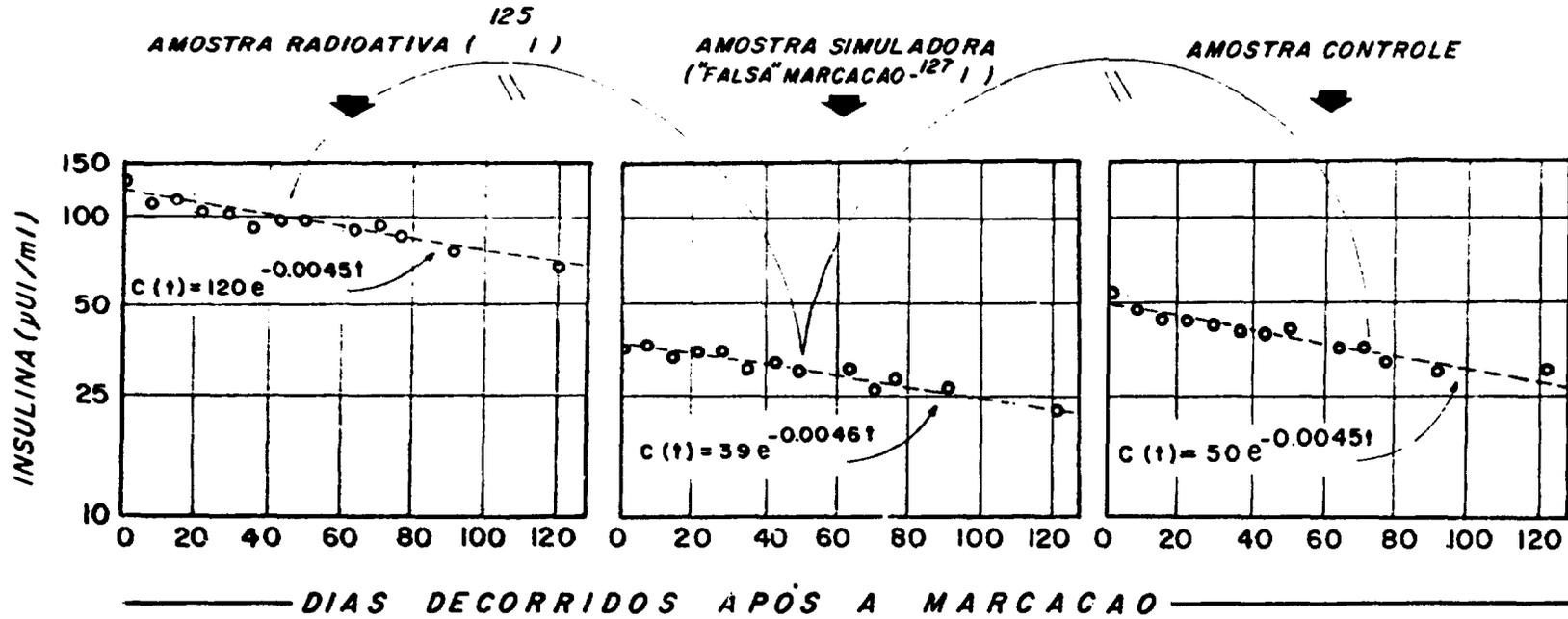


Figura 2 - Resultados da concentração em função do tempo de três amostras de insulina.

IV – ESTUDO DA DEGRADAÇÃO IMUNOGÊNICA DA INSULINA-¹²⁵I - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2 acham-se registrados os níveis de concentração em uUI/ml das três amostras de prova. Como se observa, o comportamento dos respectivos pontos experimentais se ajustaram com boa correlação ($\bar{r} = 0,9742$) ao modelo exponencial. Os dados da Figura 2 se assemelham as características dos casos 1, 3 e 4. Desses o de nº 4 foi selecionado em virtude de conhecimento prévio de que $f_* = 0,72$, o que diferencia dos casos 1 e 3 em que f_* é igual a 1.

Aceitando-se o caso 4 como válido para descrever a degradação da amostra radioativa da insulina infere-se que tanto a fração f_* da insulina (radioiodada) como a fração $1 - f_*$ (não radioiodada) se degradam, provavelmente, com o mesmo ritmo, hipótese reforçada pela identidade de comportamento daquela amostra proveniente da radiomarcagem falsa. A amostra ¹²⁵I-insulina nas condições aqui descritas apresentou em média constante de degradação de $0,0045 \text{ dia}^{-1}$ ou meia vida de 150 dias aproximadamente.

A título de exemplo, aceitando-se para fins de radioimunoensaio, a radioinsulina com 15% de impureza, então o seu prazo de validade, inferido da Figura 2 será de 36 dias.

Os dados experimentais indicaram que o processo de degradação não guardou correlação de dependência com o decaimento radioativo do ¹²⁵I incorporado na molécula indicando-se que a introdução do ¹²⁵I na mesma não comprometeu imunologicamente a estrutura da radioinsulina.

Devido a complexidade da reação antígeno anticorpo deve-se ter em atenção que resultados desta natureza podem depender da qualidade e características do anti-soro utilizado. Assim, determinados danos na molécula poderão ser percebidos ao nível imunorreativo por um anti-soro e não ser percebido por outro. Consequentemente o mesmo radiotraçador colocado a reagir com diferentes anti-soros poderá se ajustar a diferentes casos aqui descritos. Mesmo nessas situações o modelo matemático se constituirá em ferramenta útil de análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERSON, S.A. & YALOW, R.S. Insulin. In: YALOW, R.S., comp. *Methods in radioimmunoassay of peptide hormones*. Amsterdam, North-Holland, 1976. p. 168-74.
2. COOPER, E. & BURKE, C.W. Primary (internal) decomposition in labelled compounds: a general mathematical treatment. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 28(9): 792-94, 1977.
3. DRAPER, N.R. & SMITH, H. An introduction to nonlinear estimation. In: DRAPER, N.R. & SMITH, H. *Applied regression analysis*. New York, Wiley, 1966. cap. 10, p. 263-304.
4. FREYCHET, P.; ROTH, J.; NEVILLE JR., D.M. Monoiodoinsulin: demonstration of its biological activity and binding to hot cells and liver membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43: 400-8, 1971.
5. EKINS, R.P. Theoretical aspects of saturation analysis: review paper. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *In vitro procedures with radioisotopes in clinical medicine and research: proceedings of the symposium, held in Vienna, Sept. 8-12, 1969*. Vienna, 1970. p. 325-53.
6. HAMADA, M.M. *Radioimunoensaio de triiodotironina (T₃) no soro. Desenvolvimento de uma técnica de fase sólida e comparação com duas técnicas de fase líquida: polietileno glicol (PEG) e duplo anticorpo*. São Paulo, 1985. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

7. MESQUITA, C. H. *Elaboração e avaliação do desempenho de programa computacional destinado ao controle de qualidade de ensaios radioligantes. Aplicação ao radioensaio de insulina.* São Paulo, 1983. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
8. MESQUITA, C. H.; Silva, C.P.G.; HAMADA, M.M *Características e normas técnicas do conjunto reativo ("kit") para doseamento de insulina humana, por radioimunoensaio.* São Paulo, IPEN-CNEN/SP, 1985. (IPEN-Inf-84).
9. MORRIS, B.J. Specific radioactivity of radioimmunoassay tracer determined by self-displacement: a re-evaluation. *Clin. Chim. Acta*, 73: 312, 1976.
10. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. A general method of fitting nonlinear regressions. In: SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6.ed. Iowa, AMES, 1967. p. 465-74.