

УДК 616.12

АНДРЕЙ ЛЬВОВИЧ ЖЕСТЯНИКОВ

кандидат медицинских наук, ассистент кафедры семейной медицины (общей врачебной практики) медицинского факультета ПетрГУ
zhestyanikov@onego.ru

НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА ДОРШАКОВА

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой семейной медицины (общей врачебной практики) медицинского факультета ПетрГУ, проректор ПетрГУ по НИР
dorshakova@psu.karelia.ru

ТАТЬЯНА АЛЕКСЕЕВНА КАРАПЕТЯН

кандидат медицинских наук, доцент кафедры семейной медицины (общей врачебной практики) медицинского факультета ПетрГУ
kara@karelia.ru

**НЕЙРОЦИРКУЛЯТОРНАЯ ДИСТОНΙΑ:
РОЛЬ ДИСБАЛАНСА МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ**

В статье представлены результаты исследования массовых концентраций химических элементов в цельной крови больных нейроциркуляторной дистонией (НЦД) и здоровых жителей Карелии с использованием метода атомно-абсорбционной спектрометрии. Показаны различия массовых концентраций элементов между группой больных и здоровых, а также между подгруппами больных. Выявлены более высокие концентрации кадмия ($0,00045 \pm 0,00066$ мг/л) и свинца ($0,00916 \pm 0,00613$ мг/л) у больных. Кроме того, выявлены: дефицит меди в обеих группах, более выраженный у больных НЦД ($0,38 \pm 0,17$ мг/л); дефицит железа у больных НЦД гипертензивного типа ($254,36 \pm 41,61$ мг/л); более низкие концентрации кобальта ($0,003 \pm 0,001$ мг/л) и марганца ($0,013 \pm 0,006$ мг/л) у больных. Получены данные о различных вариантах взаимосвязи массовых концентраций элементов. Выявленные особенности микроэлементного статуса следует учитывать при разработке лечебно-профилактических программ для населения региона, а также при планировании дальнейших исследований.

Ключевые слова: нейроциркуляторная дистония, железо, медь, кобальт, марганец, свинец, кадмий, атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией, Север

Нейроциркуляторная дистония является актуальной междисциплинарной медико-социальной проблемой, на что обращает внимание ряд исследователей [12], [21]. Вместе с тем многие вопросы патогенеза данного заболевания, в том числе с учетом региональных особенностей, остаются недостаточно ясными и изученными. При рассмотрении этой патологии важно учитывать целый комплекс экзогенных средовых влияний, которые могут играть существенную роль в ее патогенезе [17]. В работах, посвященных особенностям патологии человека на Севере, подчеркивается важность анализа НЦД с точки зрения адаптационного процесса у северян, с учетом характерных для северных регионов климатических и биогеохимических условий

[3], [17], [18]. При этом отмечается, что сердечно-сосудистая система выступает демонстративным объектом для иллюстрации того, как адаптационные сдвиги гемодинамики у северян могут переходить в дизадаптацию, а затем в патологию. В вышеуказанных процессах существенное место занимают механизмы метаболической адаптации, которые, в свою очередь, во многом зависят от особенностей микроэлементного статуса человека [4], [11]. Дисбаланс химических элементов в среде обитания региона Карелии играет серьезную роль в формировании нарушений здоровья у населения [24]. Вместе с тем мы не встретили опубликованных научных работ, в которых содержится анализ особенностей микроэлементного статуса у больных НЦД, в том

числе с учетом региональных особенностей становления патологии. В связи с вышеизложенным проведение такого исследования мы сочли особенно актуальным.

Цель исследования – определение и сравнительный анализ массовых концентраций эссенциальных (железа, меди, кобальта, марганца) и токсичных (кадмия и свинца) микроэлементов (МЭ) в цельной крови больных НЦД и здоровых жителей Карелии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего обследовано 140 человек в возрасте от 18 до 35 лет, постоянно проживающих в г. Петрозаводске. Первую группу составили 80 больных нейроциркуляторной дистонией, 51 мужчина и 29 женщин, госпитализированных для обследования в Больницу скорой медицинской помощи г. Петрозаводска. При постановке диагноза руководствовались основными и дополнительными диагностическими критериями НЦД, широко используемыми как в клинической практике, так и в научно-исследовательских работах [2], [12], [13]. Все обследуемые лица (больные и здоровые) не принимали препаратов и биологически активных добавок, содержащих витамины, макро- и микроэлементы. С учетом клинических проявлений в группе больных выделены 3 подгруппы: 60 человек (75 %) с НЦД гипертензивного типа, 14 человек (17,5 %) – гипотензивного и 6 (7,5 %) – кардиального типа. Контрольную группу составили 60 здоровых лиц того же возраста, 32 мужчины и 28 женщин, являющиеся регулярными донорами и постоянно проживающие в Петрозаводске. Критерием отбора было отсутствие жалоб и симптомов вегетативного и циркуляторного характера, выявляемых при активном опросе и объективном исследовании. Забор цельной крови из вены проводили по стандартной методике в полимерные пробирки с добавленным гепарином, затем герметично их закрывали. Накопление и хранение материала происходило в условиях холодильной камеры при -20°C . Перед проведением анализа проба размораживалась до комнатной температуры в течение 1 часа. Определение микроэлементов проводилось по аттестованным методикам, рекомендованным для применения в медицинских исследованиях [10], [20]. Использовался атомно-абсорбционный спектрометр с электротермической атомизацией «МГА-915», разработанный научно-производственной фирмой аналитического приборостроения «ЛЮМЭКС» и зарегистрированный в Государственном реестре средств измерений Российской Федерации под номером 17309-98. Основными достоинствами данного аналитического комплекса являются: низкие пределы обнаружения, высокая селективность и минимальная пробоподготовка. Статистическую обработку результатов проводили с помощью лицензионных статистических программ R.1.9.1 и Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Массовые концентрации (МК) кадмия (Cd) и свинца (Pb) у больных были достоверно выше, а железа (Fe), кобальта (Co), меди (Cu), марганца (Mn) – ниже (табл. 1). При наличии достоверных различий между группой больных и здоровых МК Cd, Pb, Mn и Co укладывались в диапазон нормального содержания этих элементов в цельной крови. Показатели МК Cu у здоровых и больных НЦД во всех подгруппах и показатели МК Fe у лиц с НЦД гипертензивного типа позволяют говорить о дефиците этих элементов, принимая во внимание данные о диапазоне их нормального содержания (табл. 1) в цельной крови [19], [22], [23], [27]. Следует отметить, что среди больных 30 человек были курящими, и у них отмечались наиболее высокие МК Cd.

Таблица 1
Массовые концентрации Cd, Pb, Fe, Cu, Co, Mn в цельной крови больных НЦД и в контрольной группе

Элемент	Диапазон нормального содержания элемента в цельной крови по литературным данным (мг/л) [19], [23], [27]	Содержание в цельной крови (мг/л)	
		Группа больных НЦД (n = 80)	Контрольная группа (n = 60)
Cd	0,00003–0,007	$0,00045 \pm 0,00066^*$	$0,00014 \pm 0,00004$
Pb	0,008–0,269	$0,00916 \pm 0,00613^*$	$0,00519 \pm 0,00289$
Fe	309–521	$278,42 \pm 57,73^*$	$433,11 \pm 81,26$
Cu	0,75–1,3	$0,38 \pm 0,17^*$	$0,65 \pm 0,23$
Co	0,0002–0,04	$0,003 \pm 0,001^*$	$0,013 \pm 0,009$
Mn	0,0016–0,075	$0,013 \pm 0,006^*$	$0,018 \pm 0,009$

* – различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Сравнительный анализ подгрупп больных (табл. 2) показал достоверные различия МК Fe, Cu, Co и Mn. МК этих элементов были наименьшими у больных с гипертензивным типом заболевания.

Таблица 2
Массовые концентрации Cd, Pb, Fe, Cu, Co, Mn в подгруппах больных НЦД

Элемент	Содержание в цельной крови (мг/л)		
	НЦД гипертензивного типа (n = 60)	НЦД гипотензивного типа (n = 14)	НЦД кардиального типа (n = 6)
Cd	$0,00051 \pm 0,00073$	$0,00023 \pm 0,00003$	$0,00034 \pm 0,00024$
Pb	$0,0097 \pm 0,0078$	$0,0102 \pm 0,0041$	$0,0086 \pm 0,0021$
Fe	$254,36 \pm 41,61^*$	$363,0 \pm 32,1$	$321,69 \pm 18,08$
Cu	$0,34 \pm 0,16^{***}$	$0,52 \pm 0,17$	$0,42 \pm 0,08$
Co	$0,0028 \pm 0,0009^{****}$	$0,0041 \pm 0,0003$	$0,0040 \pm 0,0001$
Mn	$0,0119 \pm 0,0055^{**}$	$0,0149 \pm 0,0048$	$0,0215 \pm 0,0056$

Примечание к таблице 2.

* – различия достоверны между подгруппами больных ($p < 0,05$): гипотензивной и гипертензивной, кардиальной и гипертензивной, кардиальной и гипотензивной;
 ** – различия достоверны между подгруппами больных ($p < 0,05$): кардиальной и гипертензивной, кардиальной и гипотензивной;
 *** – различия достоверны между гипертензивной и гипотензивной подгруппами ($p < 0,05$);
 **** – различия достоверны между подгруппами больных ($p < 0,05$): кардиальной и гипертензивной, гипотензивной и гипертензивной.

Нам представлялось важным сравнить полученные данные с результатами других исследований. Данные, полученные при исследовании МК элементов в цельной крови у жителей Московской и прилегающих к ней областей [6], говорят о более высоком содержании у них Cd, Pb по сравнению с жителями Карелии и о достаточно низком содержании Fe и Cu (табл. 3).

Таблица 3

Сравнение массовых концентраций МЭ в цельной крови жителей Центрального региона России [6] и жителей Карелии

Элемент	Среднее содержание у здоровых россиян центра страны (Московской и прилегающих к ней областей) (мг/л)	Среднее содержание у здоровых жителей Карелии (мг/л)	Среднее содержание у больных НЦД региона Карелии (мг/л)
Cd	0,014	0,00014	0,00045
Pb	0,054	0,00519	0,00916
Fe	287	433,11	278,42
Cu	0,62	0,65	0,38
Co	0,007	0,0127	0,0031
Mn	0,009	0,018	0,013

Проведенный корреляционный и регрессионный анализ (с графическим изображением полученных данных, представленный на рисунке 1) выявил важные зависимости между элементами. Нам представлялось особенно важным провести анализ взаимосвязи между МК Fe, Cu и Co, учитывая данные о синергичном характере их взаимодействия, и между МК Cd и Fe с учетом данных об антагонизме данных элементов [19], [22], [27].

Зависимость между Fe, Cu и Co характеризуется прямой связью (коэффициент корреляции Fe с Cu – 0,28; Fe с Co – 0,78): при возрастании МК Fe также возрастают МК Cu и Co; при уменьшении МК Fe происходит снижение МК двух других указанных элементов; в случае изменений МК Cu и Co в сторону их увеличения или уменьшения соответственно будут изменяться показатели Fe. Зависимость между Cd и Fe обратная (коэффициент корреляции Fe с Cd – -0,28): при увеличении МК Cd снижаются МК Fe, при увеличении МК Fe снижаются МК Cd.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представляется важным установление достоверности различий МК микроэлементов у больных НЦД и здоровых жителей Карелии, а также между подгруппами больных. Следует отметить низкие МК Fe у больных НЦД гипертензивного типа и Cu – у здоровых и больных, с наименьшими показателями у лиц с гипертензивным типом заболевания. Важно подчеркнуть, что латентный дефицит Fe, длительно, порой многие годы протекающий без манифестной клинико-лабораторной симптоматики, является актуальной медицинской проблемой, особенно для регионов с неблагоприятными для человека климатическими и геохимическими условиями [14], [26]. У обследованных нами больных не было клинико-лабораторных данных, позволяющих говорить о наличии железодефицитной анемии. Следует отметить, что показатели МК Fe и Cu у жителей центральных районов России также свидетельствуют о достаточно низком содержании этих элементов на фоне более высоких МК Cd и Pb по сравнению с жителями Карелии (табл. 3). Эти особенности могут быть связаны с более высокой антропогенной нагрузкой у жителей центральных районов России, при которой усиливаются конкурентные взаимодействия между токсичными (Cd и Pb) и эссенциальными (Fe и Cu) элементами. Наиболее низкие МК Fe у больных НЦД гипертензивного типа имеют свое патогенетическое объяснение. При дефиците Fe снижается активность ферментов альдегидоксидазы и аминоксидазы, регулирующих обмен ряда биологически активных соединений, в том числе катехоламинов, в результате чего нарушается их катаболизм и возрастает содержание указанных медиаторов в биосредах человеческого организма [7]. Данные изменения, очевидно, усиливают симпатикотонические влияния на сердечно-сосудистую систему. В исследовательских работах показано усиление вегетативных симпатикотонических влияний с формированием гиперкинетического состояния кровообращения при железодефицитных состояниях [8]. Важно отметить выявленные корреляционные зависимости МК: положительные – Fe, Cu, Co и отрицательные – Fe и Cd. Эти данные наглядно демонстрируют, что в нашем исследовании мы имеем дело не с проблемой недостатка отдельных элементов с клинической маской НЦД, а с дефицитом и дисбалансом комплекса МЭ, часть из которых (Cu, Co) выступают как синергисты Fe, а другая часть (Cd, Pb) – как антагонисты. На основании данных корреляционного анализа есть основания полагать, что более высокие МК Cd и Pb у больных являются одним из первичных механизмов, способствующих снижению содержания Fe. Синергичный и антагонистический характер взаимодействия Fe с другими элементами нагляден и показателен для объяснения результатов исследования, но это только

одна из патогенетических особенностей, которую необходимо учитывать. Еще одна вероятная причина низких МК Fe у больных – ограниченная биодоступность и усваиваемость негемного Fe, содержащегося в природных средах. Очевидно, что у жителей Карелии, с характерными для данного региона климатическими и биогеохимическими условиями, имеются существенные особенности обмена МЭ, позволяющие длительно сохранять гемоглобиновый фонд Fe и активизировать дополнительные, резервные механизмы гемопоэза. Эти особенности метаболизма Fe у жителей Севера анализируются в работах А. Г. Марачева, А. А. Жаворонкова [14], Ю. П. Никитина, Э. Я. Журавской [16]. В этих же исследованиях обозначена еще одна важная проблема, актуальная и для нашей работы, – определение границ понятия «норма» для показателей элементного статуса жителей различных регионов. Полагаем, что эта проблема пока еще изучена недостаточно и требует проведения дальнейших исследований. Возможно, есть смысл говорить не только об абсолютной норме, но и о таком диапазоне содержания элементов в биосредах человеческого организма (с учетом их взаимодействия), при котором обеспечивается «выгодная» для здоровья жителей региона толерантная метаболическая адаптация в данных климатических и биогеохимических условиях. В связи с наиболее низкими МК Cu и Mn у больных НЦД гипертензивного типа следует отметить существенную роль данных элементов и содержащих их антиокислительных металлоферментов в механизмах антиоксидантной защиты организма, регуляции артериального давления и, в целом, деятельности сердечно-сосудистой системы [5], [9], [15], [25], [28], [29], [31], [32]. Есть основания полагать, что недостаток Cu и Mn у больных НЦД гипертензивного типа приводит к ослаблению активности антиоксидантных металлоферментов (в частности, марганец-зависимой и медь-цинк-зависимой супероксиддисмутаз), которые тормозят инактивацию оксида азота (эндотелиального релаксирующего фактора) продуктами перекисного окисления липидов, в результате чего усиливаются вазоконстрикторные влияния.

ВЫВОДЫ

1. У больных НЦД, проживающих в Карелии, выявлены существенные особенности микроэлементного статуса, которые, по всей видимости, играют серьезную роль в патогенезе данного заболевания.

2. Микроэлементный статус больных НЦД характеризуется более низкими МК эссенциальных МЭ (Fe, Cu, Co, Mn) и более высокими – токсичных МЭ (Cd и Pb) по сравнению со здоровыми.

3. Выявленные особенности микроэлементного статуса следует учитывать при разработке

профилактических программ для населения региона, направленных на предупреждение развития и снижение риска прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний. В структуру таких профилактических мероприятий целесообразно включать дополнительные диетические рекомендации (в частности, достаточное употребление красного мяса и курицы нежирных сортов, рыбы, овсяной и гречневой круп, творога, введение в рацион свеклы, моркови, томатов), применение фитосредств (крапивы двудомной, череды трехраздельной, земляники лесной, шиповника, листьев и плодов смородины, плодов рябины), использование витаминно-микроэлементных комплексов, что позволит улучшить обеспеченность организма Fe, Cu, Co, Mn, а также витаминами С и Е в качестве синергистов указанных МЭ.

4. Дальнейшее изучение микроэлементного статуса у больных НЦД, проживающих в неблагоприятных биогеохимических условиях Севера (в том числе и в Карелии), представляется важным и перспективным направлением.

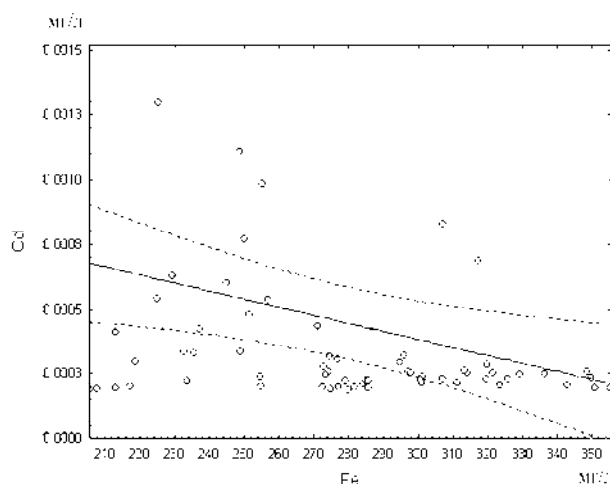


Рис. 1а

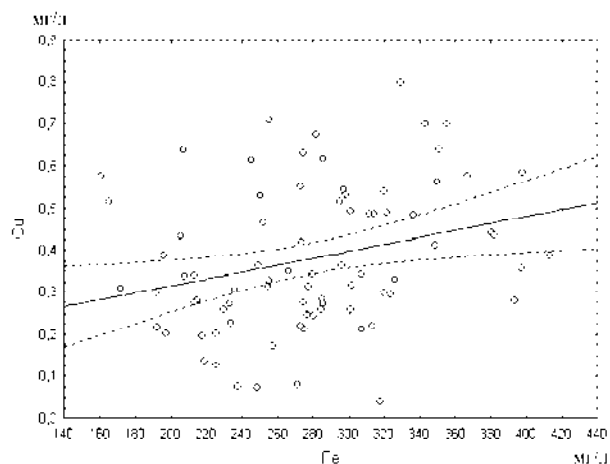


Рис. 1б

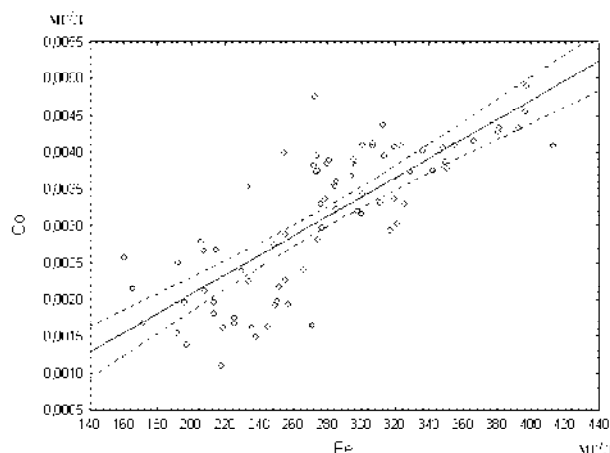


Рис. 1в

Регрессионная зависимость МК элементов

- а) МК Cd и Fe. По оси абсцисс – массовые концентрации железа (Fe) (мг/л); по оси ординат – массовые концентрации кадмия (Cd) (мг/л). Сплошная линия между осями – линия регрессии; прерывистые линии между осями – 95 % доверительный интервал; круги – отдельные наблюдения;
- б) МК Cu и Fe. По оси абсцисс – массовые концентрации железа (Fe) (мг/л); по оси ординат – массовые концентрации меди (Cu) (мг/л);
- в) МК Co и Fe. По оси абсцисс – массовые концентрации железа (Fe) (мг/л); по оси ординат – массовые концентрации кобальта (Co) (мг/л);

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аббакумов С. А. Нейроциркуляторная дистония // Врач. 1997. № 2. С. 6–8.
- Аббакумов С. А. Дифференциальная диагностика нейроциркуляторной дистонии с гиперкинетическим синдромом и гипертонической болезни без поражения органов-мишеней // Врач. 2003. № 2. С. 26–28.
- Авцын А. П., Жаворонков А. А., Марачев А. Г. и др. Патология человека на Севере. М.: Медицина, 1985. 416 с.
- Агаджанян Н. А., Скальный А. В. Химические элементы в среде обитания и экологический портрет человека. М.: КМК, 2001. 83 с.
- Антонов А. В., Якобсон Г. С., Васькина Е. А. Нарушения обмена микроэлементов при артериальной гипертензии и инфаркте миокарда // Российский кардиологический журнал. 2002. Т. 35. № 3. С. 67–71.
- Барашков Г. К., Балкаров И. М., Зайцева Л. И. и др. Диапазон содержания тяжелых металлов (ТМ) в цельной крови взрослых россиян центра страны // Микроэлементы в медицине. 2003. Т. 4. № 3. С. 6–12.
- Бугланов А. А., Саяпина Е. В., Тураев А. Т. Биохимическая и клиническая роль железа // Гематология и трансфузиология. 1991. Т. 36. № 9. С. 36–37.
- Волков В. С., Кириленко Н. П. О вегетативно-соматических нарушениях у больных железодефицитной анемией // Гематология и трансфузиология. 1999. Т. 44. № 3. С. 43–44.
- Ельчанинова С. А., Смагина И. В., Кореньяк Н. А. и др. Влияние интервальной гипоксической тренировки на процессы перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов // Физиология человека. 2003. Т. 29. № 3. С. 72–75.
- Ермаченко Л. А., Ермаченко В. М. Атомно-абсорбционный анализ с графитовой печью: Методическое пособие для практического использования в санитарно-гигиенических исследованиях. М.: ПАИМС, 1999. 220 с.
- Кудрин А. В., Скальный А. В., Жаворонков А. А. и др. Иммунофармакология микроэлементов. М.: КМК, 2000. 537 с.
- Маколкин А. И., Ромасенко Л. В. Актуальные проблемы междисциплинарного сотрудничества при лечении психосоматических расстройств // Терапевтический архив. 2003. Т. 75. № 12. С. 5–8.
- Маколкин В. И., Аббакумов С. А. Диагностические критерии нейроциркуляторной дистонии // Клиническая медицина. 1996. Т. 74. № 3. С. 22–24.
- Марачев А. Г., Жаворонков А. А. Акклиматизационный дефицит железа // Физиология человека. 1987. Т. 13. № 4. С. 640–646.
- Моисеева О. М., Александрова Л. А., Емельянов И. В. и др. Роль оксида азота и его метаболитов в регуляции сосудистого тонуса при гипертонической болезни // Артериальная гипертензия. 2003. Т. 9. № 6. С. 202–205.
- Никитин Ю. П., Журавская Э. Я. Железодефицитные состояния и анемии в Сибири и на Севере. Новосибирск: Наука, 2003. 84 с.
- Покалев Г. М., Варварина Г. Н., Виноградова Е. Г. Функциональные заболевания. Н. Новгород: Нижегородский гуманитарный центр, 2002. 287 с.
- Пуликов А. С., Краснощекова В. И., Быков О. С. и др. Адаптационные предпосылки сердечно-сосудистых дистоний в экстремальных условиях Севера // Сосудистые дистонии в экологических условиях Крайнего Севера и Сибири среди коренного и пришлого населения и их предупреждение: Тез. докл. Красноярск, 1982. С. 20–23.
- Ребров В. Г., Громова О. А. Витамины и микроэлементы. М.: АЛЕВ-В, 2003. 670 с.
- Рутковский Г. В., Глушков Р. К., Колбасов С. Е. и др. Лабораторная диагностика субхронических интоксикаций соединениями свинца, меди, цинка и марганца атомно-абсорбционным методом: Пособие для врачей-лаборантов. СПб., 2001. 14 с.
- Сидоренко Г. И. Нейроциркуляторная дистония // Кардиология. 2003. Т. 43. № 10. С. 93–98.
- Скальный А. В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. М.: Изд. дом «ОНИКС-21 век»: Мир, 2004. 216 с.
- Скальный А. В., Рудаков И. А. Биоэлементы в медицине. М.: Изд. дом «ОНИКС-21 век»: Мир, 2004. 272 с.
- Ширинкин С. В. Характеристика микроэлементного статуса при пневмонии у жителей региона Карелии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Петрозаводск, 2003. 19 с.

25. Шумков В. А. Влияние клинико-биохимических факторов на уровень меди и магния в плазме и эритроцитах у больных гипертонической болезнью I и II стадии // Диагностика и лечение нарушений системного и регионарного кровообращения: Труды ПГМИ. Пермь, 1979. Т. 146. Вып. 1. С. 26–28.
26. Шустов В. Я. Значение микроэлементов в развитии железодефицитных анемий в Поволжье // Гематология и трансфузиология. 1988. Т. 33. № 6. С. 32–35.
27. Эмсли Дж. Элементы: Пер. с англ. М.: Мир, 1993. 256 с.
28. Ярема Н. И., Коновалова Г. Г., Ланкин В. З. Изменение активности антиоксидантных ферментов у больных гипертонической болезнью // Кардиология. 1992. Т. 32. № 3. С. 46–48.
29. Alissa E. M., Bahijri S. M., Lamb D. J. et al. The effects of coadministration of dietary copper and zinc supplements on atherosclerosis, antioxidant enzymes and indices of lipid peroxidation in the cholesterol-fed rabbit // Int. J. Exp. Pathol. 2004. Vol. 85. № 5. P. 265–275.
30. Malec F., Dvorac J., Jiresova E. et al. Difference of baseline serum copper levels between groups of patients with different one year mortality and morbidity and chronic heart failure // Centr. Eur. J. Public Health. 2003. Vol. 11. № 4. P. 198–201.
31. Tang Y. R., Zhang S. Q., Xiong Y. et al. Studies of five microelement contents in human serum, hair, and finger-nails correlated with aged hypertension and coronary heart disease // Biol. Trace Elem. Res. 2003. Vol. 92. № 2. P. 97–104.
32. Yanagisawa H., Sato M., Nodera M. et al. Excessive zinc intake elevates systemic blood pressure levels in normotensive rats – potential role of superoxide-induced oxidative stress // J. Hypertens. 2004. Vol. 22. № 3. P. 543–550.