

# Антимикробные свойства антисептической композиции пролонгированного действия

Г. К. ПАЛИЙ, А. А. НАЗАРЧУК, Д. В. ПАЛИЙ, Г. Г. НАЗАРЧУК,  
О. О. ГОНЧАР, В. В. СУХЛЯК, Ю. Ю. ТРОФИМЕНКО, Н. В. ЗАДЕРЕЙ, О. К. СТУКАН

Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Винница, Украина

## Antimicrobial Properties of Antiseptic Composite with Prolonged Action

G. K. PALY, A. A. NAZARCHUK, D. V. PALY, G. G. NAZARCHUK, O. O. GONCHAR,  
V. V. SUKHLIYAK, YU. YU. TROFIMENKO, N. V. ZADEREI, O. K. STUKAN

N. I. Pirogov Vinnitsa National Medical University, Vinnitsa, Ukraine

**Исследованы антимикробные свойства антисептической композиции на основе декаметоксина и модифицированных полисахаридов (карбоксиметилкрахмал, оксиэтилцеллюлоза). Показано, что антисептическая композиция обладает высокими противомикробными свойствами в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий в разных условиях опытов.**

**Ключевые слова:** антисептики, декаметоксин, карбоксиметилкрахмал, оксиэтилцеллюлоза, антимикробные свойства.

**Antimicrobial properties of a composite based on decamethoxine and modified polysaccharides (carboxymethylamyllum, oxyethylcellulose) were studied. The composite was shown to have high antimicrobial activity against grampositive and gramnegative bacteria under different conditions of the experiment.**

**Key words:** antiseptics, decamethoxine, carboxymethylamyllum, oxyethylcellulose, antimicrobial properties.

## Введение

Хирургическая инфекция кожи и мягких тканей занимает ведущие позиции в общей структуре хирургической заболеваемости во всём мире и достигает 70%. Ежегодно регистрируют около 5 млн больных гнойно-воспалительными заболеваниями. Данные отчётов национальной системы наблюдения за нозокомиальными инфекциями (CDC's National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS), США) свидетельствуют о том, что инфекционные осложнения после хирургических вмешательств занимают третье место среди наиболее регистрируемых инфекций и составляют 14–16% всех нозокомиальных инфекций среди госпитализированных пациентов [1–4].

Благодаря современной антибактериальной терапии, внедрению эффективных методов хирургической обработки гнойного очага, удалось улучшить использование современных противомикробных материалов. В условиях высокого уровня антибиотикорезистентности клинических штаммов микроорганизмов лечение гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких

тканей представляет собой сложный, длительный процесс [5].

На местном уровне чрезвычайно важная роль в профилактике инфекционных осложнений ран принадлежит эффективным, оказывающим пролонгированное действие антимикробным материалам. Среди множества разных методов профилактики и лечения раневой инфекции огромное внимание уделяют применению современных раневых покрытий на основе антисептиков [6].

В качестве носителей для антисептиков используют различные материалы (полиметилметакрилат, коллаген, гидроксиапатит, сульфат кальция, полиангидрид и т. д.). Технология разработки антимикробных материалов предусматривает использование антисептических препаратов; их композиций с биополимерами разной химической природы [8]. Преимущественно для этого используют альгинаты, поливиниловый спирт, различные полисахариды. Идеальной композиции, которая обеспечивала бы длительную дозированную десорбцию антисептика в очаг инфекционного воспаления, не существует. Поиск такой композиции возможен при использовании в модели «антисептик-закрепитель» веществ, неспособных во время физико-химического взаимодействия изме-

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: g\_paliy@ukr.net

нять химическую структуру друг друга, быстро разрушаться в растворах в присутствии белков плазмы крови и при изменении рН среды [6–8]. Оригинальная антимикробная композиция с декаметоксином и биodeградируемыми модифицированными полисахаридами карбоксиметилкрахмалом, оксиэтилцеллюлозой (патент UA №74853 от 12.11.2012 года) восполняет этот пробел в определённой степени [9].

Цель исследования — определить противомикробные свойства антисептической композиции пролонгированного действия в различных условиях опытов.

## Материал и методы

Декаметоксин (ДКМ) является оригинальным антисептическим лекарственным препаратом, получение которого проведено в СССР [10, 11]. Доказано, что ДКМ обладает антибактериальным, противовирусным, фунгицидным действием, повышает чувствительность резистентных вариантов бактерий к антибиотикам, что открывает хорошую перспективу для профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

ДКМ прошел 13.04.2012 г. государственную регистрацию в Украине. Министерство здравоохранения (МЗ) Украины выдало регистрационное удостоверение на лекарственное средство Декаметоксин (субстанция), которое утверждено приказом МЗ Украины 13.04.2012 г., №264. Синтез субстанции декаметоксина осуществляет Общество с ограниченной ответственностью «Фармхим» (Украина).

Существенные результаты получены при исследовании закономерности и механизма формирования устойчивости к ДКМ у микроорганизмов. Отмечено, что ДКМ не оказывает отрицательного воздействия на иммунную систему макроорганизма, обладает десенсибилизирующим действием, замедляет развитие анафилактического шока. Установлено, что у ДКМ отсутствует мутагенное действие. ДКМ обладает выраженным профилактическим, лечебным действием в различных лекарственных формах (таблетки, глазные капли, мази, суппозитории, растворы).

**Таблица 1.** Характеристика антимикробной активности препаратов при различном значении рН питательной среды

Микроорганизмы	рН питательной среды					
	6,0	7,2*	8,0	6,0	7,2*	8,0
	декаметоксин (0,1%)			антисептическая композиция		
	<b>МБсК**, мкг/мл (<math>M \pm m</math>)</b>					
<i>S.aureus</i> (n=131)	0,54±0,36	0,74±0,50	1,55±0,93	0,44±0,39	0,56±0,44	0,95±0,56
p	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>E.coli</i> (n=123)	1,83±1,23	2,70±1,74	4,72±2,51	1,38±0,79	2,32±1,47	4,06±2,45
p	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (n=20)	5,95±3,07	7,02±2,71	12,09±3,98	4,00±1,48	6,34±2,09	8,97±3,60
p	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (n=20)	32,0±17,18	40,63±14,69	84,38±30,59	19,51±6,95	21,08±7,66	32,03±11,87
p	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
	<b>МБцК***, мкг/мл (<math>M \pm m</math>)</b>					
<i>S.aureus</i> (n=131)	1,14±0,82	1,50±1,01	3,12±1,66	0,82±0,57	1,10±0,86	1,97±1,04
p	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>E.coli</i> (n=123)	3,65±2,86	4,88±2,85	9,64±5,39	3,10±2,82	4,45±2,07	7,93±3,83
p	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (n=20)	11,3±3,98	16,39±5,62	29,68±13,32	9,75±3,47	15,99±7,38	19,12±7,39
p	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (n=20)	74,9±25,66	84,38±30,59	144,7±83,85	21,08±7,66	35,94±11,45	62,05±0
p	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05

**Примечание.** \* — контроль; \*\*МБсК — минимальная бактериостатическая концентрация; \*\*\*МБцК — минимальная бактерицидная концентрация; p — в сравнении с контролем.

В исследовании использовали водный раствор декаметоксина (ДКМ) 0,1%, композицию (КП) на основе декаметоксина с карбоксиметилкрахмалом (КМК), оксиэтилцеллюлозой (ОЭЦ) и поливинилацетатной дисперсией, состав которой приводим ниже. Антисептическую композицию (КП) готовили следующим образом. В ёмкости с мешалкой при температуре 20–30°C смешивали последовательно полимерные компоненты (натриевая соль карбоксиметилкрахмала — 0,9 мас.%; водный раствор оксиэтилцеллюлозы — 0,4 мас.%; поливинилацетатная дисперсия 0,2 мас.%), декаметоксин 0,1 мас.% согласно рецептуре. Композиция представляет собой антисептический раствор, обладающий способностью к плёнокообразованию на поверхности текстильных материалов [9].

Изучение антимикробной активности разработанного состава полимерной композиции проводили по основным показателям, имеющим значение для придания материалам пролонгированного антимикробного действия. Нами проводилось сравнительное изучение бактериостатической и бактерицидной активности антисептической композиции. При этом определяли минимальную бактериостатическую (МБсК) и минимальную бактерицидную (МБцК) концентрации КП по общепринятой методике [3].

Антимикробное действие препаратов изучали на *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; клинических штаммах *S.aureus* (n=130), *Echerichia coli* (n=123), *Pseudomonas aeruginosa* (n=20), *Klebsiella pneumoniae* (n=20), которые имели типичные тинкториальные, морфологические, культуральные, биохимические свойства. Противомикробную активность ДКМ, антисептической КП изучали по общепринятой методике в различных опытах (питательная среда с рН 6,0–8,0; питательные среды, содержащие 5%; 10% сыворотки крови; концентрации микробов: Ig3 КОЕ/мл, Ig6 КОЕ/мл, Ig9 КОЕ/мл) [3]. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Microsoft Exel 2007 и «Med Stat» [12].

## Результаты и обсуждение

Проведённые исследования показали, что КП проявляла антимикробные свойства. Установлено низкие значения бактериостатических и бактерицидных концентраций исследуемой антисептической КП в отношении *S.aureus*, *E.coli*,

**Таблица 2.** Характеристика антимикробной активности препаратов при различных значениях количества белков плазмы крови в питательной среде

Микроорганизмы	% состав белка плазмы крови в питательной среде					
	0*			10		
	декаметоксин (0,1%)			антисептическая композиция		
	<b>МБсК, мкг/мл (<math>M \pm m</math>)</b>					
<i>S.aureus</i> (n=131)	0,74±0,50	0,46±0	2,77±1,89	0,56±0,44	1,01±0,70	2,08±1,43
<i>p</i>	—	<0,01	<0,01	—	<0,01	<0,01
<i>E.coli</i> (n=123)	2,70±1,74	5,22±2,93	9,29±4,25	2,32±1,47	4,41±2,57	7,74±3,16
<i>p</i>	—	<0,01	<0,01	—	<0,01	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (n=20)	7,02±2,71	15,61±8,79	28,51±16,68	6,34±2,09	12,68±6,06	21,47±9,45
<i>p</i>	—	<0,05	<0,05	—	<0,05	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (n=20)	40,63±14,69	65,62±22,42	118,25±19,24	21,08±7,66	34,38±9,62	62,50±0
<i>p</i>	—	<0,05	<0,05	—	<0,05	<0,05
	<b>МБцК, мкг/мл (<math>M \pm m</math>)</b>					
<i>S.aureus</i> (n=131)	1,50±1,01	2,83±1,95	4,86±3,02	1,10±0,86	2,02±1,12	3,85±1,97
<i>p</i>	—	<0,01	<0,01	—	<0,01	<0,01
<i>E.coli</i> (n=123)	4,88±2,85	9,89±5,69	18,56±13,05	4,45±2,07	9,23±5,10	15,89±7,67
<i>p</i>	—	<0,01	<0,01	—	<0,01	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (n=20)	16,39±5,62	32,03±14,77	49,22±17,02	15,99±7,38	28,90±5,73	48,44±18,21
<i>p</i>	—	<0,05	<0,05	—	<0,05	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (n=20)	84,38±30,59	150,0±62,75	212,50±58,77	35,94±11,45	71,88±22,90	112,50±25,65
<i>p</i>	—	<0,05	<0,05	—	<0,05	<0,05

**Примечание.** \* — контроль (питательная среда без белков плазмы крови); *p* — по сравнению с контролем.

**Таблица 3.** Антимикробная активность антисептических препаратов в условиях изменения концентрации КОЕ

Микроорганизмы	Концентрация КОЕ в питательной среде, КОЕ/мл					
	10 <sup>3</sup>			10 <sup>9</sup>		
	декаметоксин (0,1%)			антимикробная композиция		
	<b>МБсК, мкг/мл (<math>M \pm m</math>)</b>					
<i>S.aureus</i> (n=131)	0,39±0,23	0,74±0,50	1,55±0,91	0,27±0,18	0,56±0,44	0,98±0,67
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>E.coli</i> (n=123)	0,78±0,99	2,70±1,74	4,84±2,43	1,43±0,77	2,32±1,47	4,14±2,42
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (n=20)	5,17±2,03	7,02±2,71	12,09±3,98	3,90±1,10	6,34±2,09	9,17±3,41
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (n=20)	28,90±5,73	40,63±14,69	137,50±38,47	17,17±4,82	21,08±7,66	34,38±9,62
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
	<b>МБцК, мкг/мл (<math>M \pm m</math>)</b>					
<i>S.aureus</i> (n=131)	0,78±0,46	1,50±1,01	3,13±1,81	0,53±0,39	1,10±0,86	2,05±1,33
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>E.coli</i> (n=123)	3,08±1,50	4,88±2,85	10,12±5,65	2,53±0,96	4,45±2,07	8,09±3,91
<i>p</i>	<0,01	—	<0,01	<0,01	—	<0,01
<i>K.pneumoniae</i> (n=20)	9,75±4,47	16,39±5,62	28,90±13,68	8,97±2,86	15,99±7,38	21,86±7,87
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05
<i>P.aeruginosa</i> (n=20)	45,31±15,95	84,38±30,59	231,25±45,79	22,64±7,99	35,94±11,45	68,75±19,24
<i>p</i>	<0,05	—	<0,05	<0,05	—	<0,05

**Примечание.** \* — контроль; *p* — по сравнению с контролем.

*K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*. Полученные результаты иллюстрирует табл. 1–3.

В исследовании определили достаточно стойкую и маловариабельную антимикробную активность КП в питательной среде с разными значениями концентрации водородных ионов. Так, в диапазоне pH питательной среды от слабокислой до слабощелочной (6,0–8,0) установили высокое противомикробное действие исследуемой КП (МБсК 0,44±0,39 — 0,95±0,56 мкг/мл) на штаммы *S.aureus*. В щелочной среде (pH до 8,0) МБсК КП составляла 0,95±0,56 мкг/мл в отношении *S.aureus*, для сравнения отметим, что МБсК ДМК составил — 1,55±0,93 мкг/мл. Бактерицидная ак-

тивность КП (МБцК — 1,97±1,04 мкг/мл) в отношении резистентных штаммов *S.aureus* при pH питательной среды 8,0 не выходила за пределы терапевтического коридора ДМК. В отношении грамотрицательных микроорганизмов антимикробное действие КП в щелочной среде также находилось на достаточно высоком уровне. В нейтральной (pH 7,2) и кислой среде (pH 6,0) мы отмечали потенцирование противомикробной активности КП в отношении штаммов *S.aureus* (МБцК — 1,10±0,86 мкг/мл; 0,82±0,57 мкг/мл). Высокое бактерицидное действие регистрировали в отношении штаммов *E.coli* (МБцК 3,10±2,82 мкг/мл). Выявлена чувствительность *K.pneumoni-*

ae к КП (МБцК  $9,75 \pm 3,47$  мкг/мл). Сдвиг pH в кислую сторону улучшал также антисептическую активность КП по отношению к *P.aeruginosa* (МБцК  $21,08 \pm 7,66$  мкг/мл). Отмечали потенцирование антипсевдомонадной активности КП в 2,3 раза по сравнению с ДКМ. Сохранение высокого противомикробного действия ДКМ в составе его КП в диапазоне pH 6,0—8,0 подтверждает химическую инертность антисептика и модифицированных полисахаридов (табл. 1).

Исследование противомикробной активности КП в условиях белковой защиты в питательной среде показало умеренное повышение минимальных бактериостатических, бактерицидных концентраций, которые не превышали терапевтического диапазона ДКМ (табл. 2).

Увеличение концентрации белков сыворотки крови в питательной среде от 5 до 10% вызывало несколько большее повышение МБсК ( $0,46 \pm 0$  —  $2,77 \pm 1,89$  мкг/мл) у ДКМ в отношении *S.aureus*, чем у КП (МБсК  $1,01 \pm 0,70$  —  $2,08 \pm 1,43$  мкг/мл;). Средние значения бактерицидных концентраций ДКМ (МБцК ( $2,83 \pm 1,95$  —  $4,86 \pm 3,02$  мкг/мл) имели аналогичную тенденцию к некоторому повышению по сравнению с антисептической КП (МБцК  $2,02 \pm 1,12$  —  $3,85 \pm 1,97$ ) в отношении *S.aureus* не превышали  $3,85 \pm 1,97$  мкг/мл. Присутствие КМК и ОЭЦ способствовало повышению противомикробной активности ДКМ в отношении штаммов *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* в условиях белковой защиты 5—10%. Следует отметить достаточную чувствительность штаммов *E.coli*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* к КП и ДКМ, поскольку практически не изменялась их противомикробная активность при концентрации белков сыворотки крови в питательной среде до 5%. Тенденцию лишь к незначительному повышению наблюдали при увеличении концентрации белков до 10% в питательной среде. В присутствии КМК и ОЭЦ антимикробная активность ДКМ по отношению к грамотрицательным микроорганизмам изменялась незначительно при белковой защите в сравнении с 0,1% ДКМ и находились в пределах значений МБцК  $15,89 \pm 7,67$  —  $112,50 \pm 26,65$  мкг/мл (табл. 2).

Установлено, что КП проявляла высокие противомикробные свойствами в условиях изменений микробной нагрузки от  $1 \cdot 10^3$  до  $1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл. По мере увеличения количества КОЕ в инокуляте уменьшалась чувствительность исследуемых штаммов микробов к ДКМ. Для КП доказана достаточно высокая антимикробная активность даже с увеличением  $1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл микроорганизмов в питательной среде. В исследовании при изменении концентрации КОЕ штаммов *S.aureus* ( $10^3$ ,  $10^6$ ,  $10^9$  КОЕ/мл) определили выраженное постоянство бактериостатической (МБсК  $0,27 \pm 0,18$  мкг/мл —  $0,98 \pm 0,67$  мкг/мл) и

бактерицидной (МБцК  $0,53 \pm 0,39$  мкг/мл —  $2,05 \pm 1,33$  мкг/мл) активности КП. При этом для КП получили невысокие значения МБсК и МБцК в отношении устойчивых штаммов грамотрицательных микроорганизмов, за счёт потенцирования противомикробной активности ДКМ. Наблюдали существенное снижение бактерицидных (МБцК  $4,45 \pm 2,07$  мкг/мл) концентраций ДКМ к штаммам эшерихий. В присутствии КП увеличение микробной нагрузки к  $10^6$ — $10^9$  КОЕ/мл не вызывало снижения антимикробного действия в отношении клебсиелл (МБцК  $21,86 \pm 7,85$  мкг/мл), практически не изменялась бактерицидная активность в экспериментах с *P.aeruginosa* (МБцК  $22,64 \pm 7,99$  —  $68,75 \pm 19,24$  мкг/мл) (табл. 3).

Важно отметить, что наличие в композиции таких компонентов КМК и ОЭЦ оказывало хороший эффект на противомикробную активность ДКМ, не уменьшая допустимых значений его бактерицидных концентраций в процессе увеличения микробной нагрузки в питательной среде, способствуя потенцированию его активности в 2—2,5 раза (см. табл. 3).

## Выводы

1. Антисептический препарат декаметоксин в композиции с модифицированными полисахаридами карбоксиметилкрахмалом, оксиэтилцеллюлозой статистически достоверно обладает высокой противомикробной активностью по отношению к исследуемым штаммам микроорганизмов в различных условиях опытов.

2. Противомикробные свойства антисептической композиции в отношении клинических штаммов стафилококков, эшерихий, клебсиелл, псевдомонад не изменяются в щелочной среде (pH 8,0), повышаются в кислой среде (pH 6,0).

3. В составе антисептической композиции модифицированные полисахариды (КМК, ОЭЦ) потенцируют противомикробную активность декаметоксина в отношении *S.aureus*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa* в условиях содержания белков плазмы в питательной среде в концентрации 5 и 10%.

4. КП характеризуется высокими антимикробными свойствами в отношении штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий в условиях микробной нагрузки в питательной среде ( $10^3$  КОЕ/мл,  $10^6$  КОЕ/мл,  $10^9$  КОЕ/мл).

5. Антисептическая композиция в условиях белковой защиты (5 или 10%), изменения pH и концентрации КОЕ/мл ( $10^3$ — $10^9$ ) обладает достаточной терапевтической эффективностью, необходимой для профилактики, лечения хирургической гнойной инфекции, вызванной штаммами патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев Е. Г., Коган А. С. Госпитальная инфекция в многопрофильной хирургической клинике. Новосибирск: Наука, 2003; 206.
2. Палий Г. К., Когет Т. О., Палий В. Г. и др. Антисептики в профилактике и лечении инфекций: монография. Киев: 1997; 201.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студ. высш. мед. уч. зав. / Под ред. В. П. Широбокова / Издание 2-е. Винница: Новая Книга, 2011; 952.
4. Волков А. О., Большакова Г. М. Микрофлора гнойных ран и современные подходы к использованию антисептиков в хирургической практике. *Annals of Mechnikov Institute* 2009; 2: 19–23 / URL: <http://www.imiamn.org/journal.htm>.
5. Афиногенов Г. Е., Тихилов Р. М., Афиногенова А. Г., Богданова Т. Я., Краснова М. В., Козлов И. В., Даровская Е. Н., Анисимова Л. О., Лебедева И. К., Петрова Т. М. Антимикробная биodeградируемая композиция на основе высокомолекулярного поливинилпирролидона для профилактики экспериментального остеомиелита. *Травматол ортопед России* 2010; 3: 57: 47–54.
6. Ефименко Н. А., Шин Ф. Е., Толстых М. П., Тепляшин А. С. Современные тенденции в создании биологически активных материалов для лечения гнойных ран. *Военно-мед журн* 2002; 1: 48–52.
7. Палий В. Г., Зарицкий А. М., Цвигун Б. Я. и др. Использование антимикробных композиций на основе декаметоксина для лечения заболеваний мочеполовой системы. *Biomed Bios Anthropol* 2005; 5: 107–111.
8. Олтаржевская Н. Д., Кричевский Г. Е. Лечебные текстильные материалы «Коллетекс» — эффективные многофункциональные депозитные системы. *Химико-фарм журн* 2005; 39; 3: 42–50.
9. Назарчук А. А., Палий В. Г., Кулаков А. И. и др. Патент №74853. Украина. Композиция для придания медицинским текстильным материалам антимикробных свойств с пролонгированным действием. Заявлено 10.05.2012; опубликовано 12.11. 2012. *Бюл.* 2012; 21: 4.
10. Paliy G. K., Markovskij, Losinskij. Decamethoxin. *Handbuch der Antiseptik. Antiseptika.* Veb Verlag Vdk Gesundheit Berlin 1987; II: 3: 552–566.
11. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 15-е изд. М.: 2007; 953.
12. Glanz S. *Medicobiologic statistics* М.: 1999; 459.