

PŮVODNÍ PRÁCE

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE
Ročník LV – Číslo 3 – KVĚTEN 2006**SYNTÉZA REAKTIVÁTORŮ FOSFORYLOVANÉ
ACETYLCHOLINESTERASY
BIS-PYRIDINIUMDIALDOXIMOVÉHO TYPU
S 3-OXAPENTANOVÝM SPOJOVACÍM
ŘETĚZCEM A JEJICH TESTOVÁNÍ *IN VITRO*
NA MODELU ENZYMU INHIBOVANÉHO
CHLORPYRIFOSEM
A METHYLCHLORPYRIFOSEM**MUSÍLEK K.¹, KUČA K.², JUN D.², DOHNAL V.³, KIM T-H.⁴, JUNG Y-S.⁴, DOLEŽAL M.¹¹Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv²Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany Hradec Králové, Katedra toxikologie³Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno, Ústav technologie potravin⁴Medicinal Science Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Yusong, Taejeon 05-606, Korea

SOUHRN

Syntéza reaktivátorů fosforylované acetylcholinesterasy bis-pyridiniumdialdoximového typu s 3-oxapentanovým spojovacím řetězcem a jejich testování *in vitro* na modelu enzymu inhibovaného chlorpyrifosem a methylchlorpyrifosem

Pesticidy (např. parathion, chlorpyrifos, methylchlorpyrifos) stejně jako nervově paralytické látky (např. soman, sarin, tabun, VX) patří do skupiny organofosforových sloučenin. Tyto látky ireverzibilně inhibují enzym acetylcholinesterasu (AChE). Byly připraveny tři nové reaktivátory AChE s 3-oxapentanovým spojovacím řetězcem. Byla srovnána schopnost těchto nových potenciálních reaktivátorů AChE se současně užívanými sloučeninami (pralidoxim, methoxim, trimedoxim, obidoxim, HI-6) reaktivovat AChE inhibovanou pesticidy. Výsledky ukázaly, že nově připravené reaktivátory AChE převyšují reaktivátory v současnosti používané v případě methylchlorpyrifosem inhibované AChE při koncentraci 10^{-3} M, která však není použitelná pro *in vivo* experimenty. Při koncentraci (10^{-5} M) jsou všechny testované sloučeniny pro methylchlorpyrifosem inhibovanou AChE prakticky neúčinné. Naopak reaktivátory v současnosti používané převyšují nově připravené látky v případě chlorpyrifosem inhibované AChE při obou koncentracích.

K l í č o v á s l o v a: organofosfát – pesticid – acetylcholinesterasa – reaktivace – *in vitro*

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 115–119

SUMMARY

Synthesis of Reactivators of Phosphorylated Acetylcholinesterase of bis-Pyridiniumdialdoxime Type with a 3-Oxapentane Connecting Chain and Their Testing *in vitro* on a Model of the Enzyme Inhibited by Chlorpyrifos and Methylchlorpyrifos

Insecticides (e.g., parathion, chlorpyrifos, methylchlorpyrifos) and nerve agents (e.g., soman, sarin, tabun, VX) belong to the group of organophosphates. They are able to irreversibly inhibit the enzyme acetylcholinesterase (AChE). Three new reactivators with a 3-oxapentane connecting chain were prepared. The ability of the new compounds to reactivate AChE inhibited by pesticides was tested *in vitro* and compared to known oximes (pralidoxime, methoxime, trimedoxime, obidoxime, HI-6). The results show that the new substances are superior to known reactivators in the case of methylchlorpyrifos-inhibited AChE at a concentration of 10^{-3} M which is unfortunately not applicable to *in vivo* experiments. All tested compounds are practically ineffective for methylchlorpyrifos-inhibited AChE at the physiological concentration (10^{-5} M). On the other hand, the known reactivators surpass new substances in the case of chlorpyrifos-inhibited AChE at both concentrations.

K e y w o r d s: organophosphate – pesticide – acetylcholinesterase – reactivation – *in vitro*

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 115– 119

Má

Úvod

Organofosforové sloučeniny (OF) se používají v zemědělství jako pesticidy, v medicíně jako potenciální léčiva či pro vojenské účely jako bojové chemické látky (nervově-paralytické látky, NPL, např. tabun, sarin, soman, VX) ¹⁻³). Hrozba intoxikací těmito látkami neustále stoupá v souvislosti s rostoucí hrozbou teroristických útoků. Časté jsou také intoxikace pracovníků v zemědělství, kteří jsou v přímém kontaktu s těmito jedy ⁴⁻⁵). Mezi nejrozšířenější látky používané pro zemědělské účely patří parathion (*O,O*-diethyl-*O*-(4-nitrofenyl)-thiofosfát), chlorpyrifos (*O,O*-diethyl-*O*-(3,5,6-trichlor-2-pyridyl)-thiofosfát) nebo methylchlorpyrifos (*O,O*-dimethyl-*O*-(3,5,6-trichlor-2-pyridyl)-thiofosfát) (schéma 1).

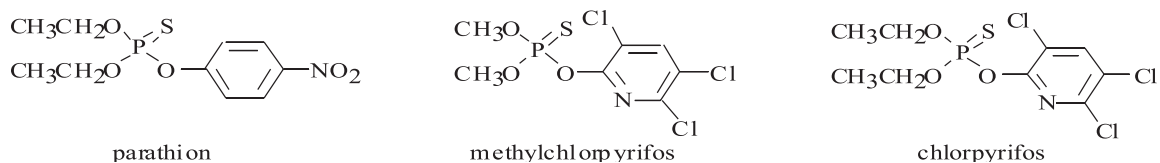


Schéma 1. Organofosforové pesticidy

Tyto látky stejně jako nervově-paralytické látky (NPL) inhibují ireverzibilně enzym acetylcholinesterasu (AChE, EC 3.1.1.7) ⁶). Jejich toxický účinek je podobně jako u NPL založen na fosforylaci aktivního místa enzymu, kde se kovalentně váží na serinový hydroxyl (schéma 2) ⁶⁻⁷).

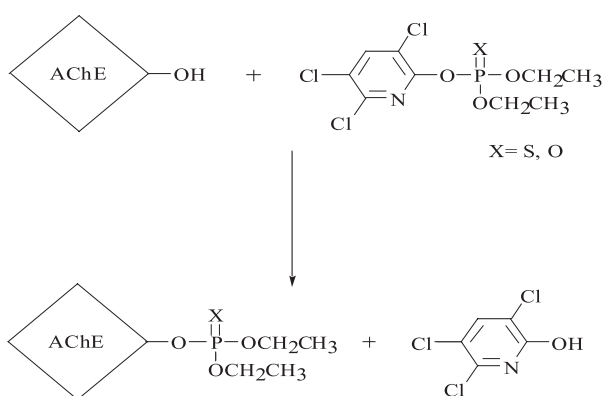


Schéma 2. Inhibice AChE pesticidem chlorpyrifosem resp. chlorpyrifosoxonem

Deriváty OF odvozené od kyseliny thiofosfonové, resp. thiofosforečné jsou méně toxické než deriváty odvozené od jejich kyslíkatých analog. Po vstupu thiofosfonátů a thiofosfátů do organismu probíhá jejich metabolizace na odpovídající oxoderiváty pomocí enzymů, zejména v krevní plazmě a jaterní tkáni. Jedná se tedy o tzv. „letální syntézu“ látky s větší afinitou k AChE a toxicitou ⁸⁻⁹).

Inhibicí AChE dochází k hyperstimulaci muskarinových a nikotinových receptorů nadbytkem acetylcholinu, poté k cholinergní krizi a u těžkých intoxikací k útlumu

dechového centra v prodloužené míše a smrti ¹⁰). Jako účinná antidota se při těchto intoxikacích užívají oximové reaktivátory AChE ve spojení s atropinem ²). K nejčastěji používaným reaktivátorům AChE lze zařadit pralidoxim (1; 2-PAM, 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridiniumchlorid), trimedoxim (2; TMB-4, 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)propan-dibromid), obidoxim (3; Toxogonin[®], 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropan-dichlorid), HI-6 (4; 1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxapropan-dichlorid) a methoxim (5; MMC, bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)methan-dichlorid) (schéma 3) ^{1, 10-14}). Žádný z dosud známých reaktivátorů však není schopen uspokojivě reaktivovat AChE inhibovanou všemi typy OF ¹⁵). Všechny uvedené sloučeniny byly vyvinuty k použití při intoxikacích NPL. V dnešních

podmínkách však stoupá nebezpečí použití ne tak toxických, ale snadněji dostupných látek (rozšířených v zemědělství), u kterých jsou tyto reaktivátory méně účinné nebo neúčinné ¹⁶⁻¹⁷).

Vzhledem k uvedeným skutečnostem je vývoj a výběr

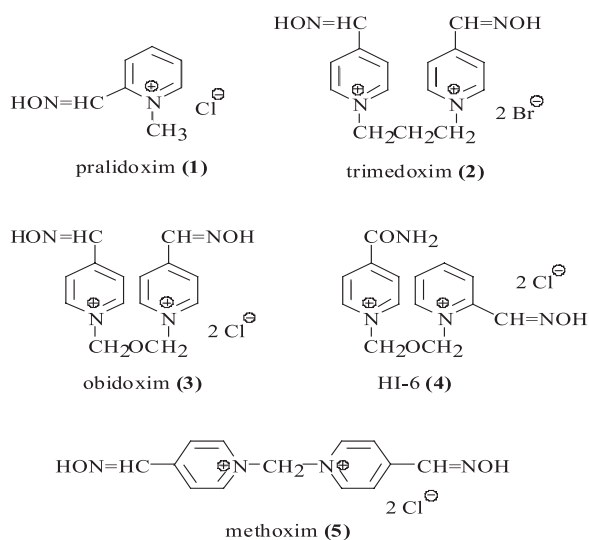


Schéma 3. Nejčastěji používané reaktivátory AChE

dostatečně účinných reaktivátorů AChE jako antidot OF velmi potřebný a důležitý. Cílem naší práce byla příprava tří nových reaktivátorů AChE s 3-oxapentanovým spojovacím řetězcem a testování jejich reaktivní účinnosti vůči chlorpyrifosem a methylchlorpyrifosem inhibované AChE *in vitro*.

POKUSNÁ ČÁST

Chemická část

Rozpouštědla (aceton, DMF, ethanol) a chemikálie byly dodány od firem Fluka a Sigma-Aldrich a použity bez dalšího přečištění. Reakce byly monitorovány pomocí TLC (DC-Alu-folien Cellulose F, Merck, Německo) s použitím soustavy BuOH-CH₂COOH-H₂O 5:1:2 a detekovány Dragendorfovým činidlem¹⁸⁾. Teploty tání byly měřeny na bodotávku PHMK 05 (VEB Kombinat Nagema, Radebeul) a nejsou korigovány.

NMR spektra byla měřena na Varian Gemini 300 (¹H 300 MHz, ¹³C 75 MHz, Palo Alto CA, USA). Chemické posuny pro ¹H i ¹³C spektra jsou uvedeny v ppm (δ) v poměru k signálu rozpouštědla DMSO (δ 2,50 pro ¹H; δ 39,43 pro ¹³C). Signály jsou uvedeny jako s (singlet), d (dublet), t (triplet) a m (multiplet).

ESI-MS spektra byla měřena s použitím vysokotlaké kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. HP1100 HPLC systém byl dodán z Agilent Technologies (Waldbronn, Německo). Skládá se z vakuového zplynovače G1322A, kvarterní pumpy G1311A, autosampleru G1313A a kvadrupólového hmotnostního spektrometru MSD1456 VL vybaveného zdrojem elektropray-ionizace. Dusík pro hmotnostní spektrometr byl získán z dusíkového generátoru Whatman 75-720. Data byla odečtena v pozitivním iontovém módu s ESI sondou o napětí 4000 V. Tlak rozprašovaného plynu byl nastaven na 35 psig. Teplota sušícího plynu byla 335 °C a průtok 13 l/min.

Nové reaktivátory AChE byly získány alkyací hydroxyiminomethylových derivátů pyridinu pomocí optimalizace známých syntetických postupů (schéma 4)¹⁹⁾.

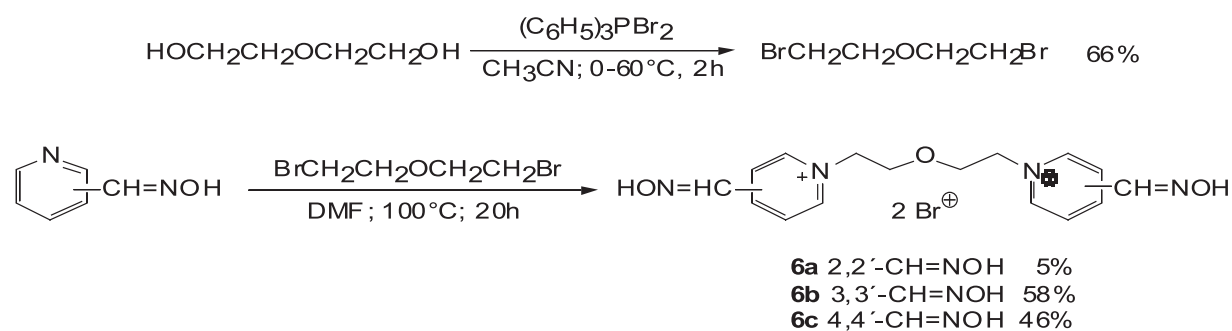


Schéma 4. Příprava nových reaktivátorů AChE

Spojovací řetězec byl připraven z komerčně dostupných sloučenin. Roztok hydroxyiminomethylpyridinu (1 g; 8,2 mmol) v DMF (5 ml) byl zahříván po dobu 20 hodin s 1,5-dibrom-3-oxapentánem (0,43 ml; 3,7 mmol). Reakční směs byla ochlazená na laboratorní teplotu a byl přidán aceton (50 ml). Precipitát byl filtrován za sníženého tlaku, promyt acetonem (3x20 ml) a rekrystalizován z CH₃CN.

(6a) 1,5-bis(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-oxapentandibromid

Výtěžek 5 %. TLC R_f 0,15. T.t. 212–216 °C (publikováno v lit. 19: 210–212 °C). ¹H NMR spektrum totožné s lit. 19. ¹³C NMR spektrum (75 MHz, DMSO d₆): δ 147,05, 146,38, 145,33, 141,57, 127,01, 125,45, 68,26, 57,14. EA: vypočítáno 40,36 % C, 4,23 % H, 11,77 % N; nalezeno 38,51 % C, 4,37 % H, 10,60 % N. ESI-MS: m/z 315,1 [M-H⁺]²⁺ (kalkulováno pro [C₁₆H₁₉N₄O₃]²⁺ 315,05).

(6b) 1,5-bis(3-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-oxapentandibromid

Výtěžek 58 %. TLC R_f 0,15. T.t. 216–220 °C. ¹H NMR spektrum (300 MHz, DMSO d₆): δ 12,25 (s, 2H; -CH=NOH), 9,23 (s, 2H; aryl), 8,98 (d, 2H, J = 6,0 Hz; aryl), 8,71 (d, 2H, J = 8,0 Hz; aryl), 8,33 (s, 2H; -CH=NOH), 8,16–8,06 (m, 2H; aryl), 4,82 (t, 2H, J = 3,8 Hz; -CH₂-), 3,96 (t, 2H, J = 4,18 Hz; -CH₂-). ¹³C NMR spektrum (75 MHz, DMSO d₆): δ 144,83, 143,18, 142,64, 141,61, 133,03, 127,70, 68,24, 60,30. EA: vypočítáno 40,36 % C, 4,23 % H, 11,77 % N; nalezeno 40,54 % C, 4,19 % H, 11,96 % N. ESI-MS: m/z 315,1 [M-H⁺]²⁺ (kalkulováno pro [C₁₆H₁₉N₄O₃]²⁺ 315,05).

(6c) 1,5-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-oxapentandibromid

Výtěžek 46 %. TLC R_f 0,15. T.t. 192–196 °C (publikováno v lit. 19: 195–198 °C)¹⁹⁾. ¹H NMR spektrum totožné s lit. 19. ¹³C NMR spektrum (75 MHz, DMSO d₆): δ 148,42, 145,38, 144,97, 123,63, 68,41, 59,60. EA: vypočítáno 40,36 % C, 4,23 % H, 11,77 % N; nalezeno 39,99 % C, 4,44 % H, 11,66 % N. ESI-MS: m/z 315,1 [M-H⁺]²⁺ (kalkulováno pro [C₁₆H₁₉N₄O₃]²⁺ 315,05).

Biochemická část

Homogenát z mozků laboratorního potkana (0,5 ml) byl smíchán s 20 μl isopropylalkoholového roztoku chlorpyrifosu nebo methylchlorpyrifosu a inkubován za teploty 25 °C po dobu 30 minut (pH 7,6). Poté bylo ke směsi přidáno 2,5 ml roztoku chloridu sodného (3 M) a doplněno na celkový objem 23 ml destilovanou vodou. Nakonec byly přidány 2 ml roztoku acetylcholin-jodidu (0,02 M). Enzymová aktivita byla měřena při pH 8,0 a teplotě 25 °C na autotitrátoru RTS 822 (Radiometer, Dánsko). Aktivita intaktního (a₀) a inhibovaného enzymu (a_i) byly odeč-

teny ze závislosti spotřeby roztoku NaOH (0,01 M) na čase. Po inkubaci chlorpyrifosem inhibované AChE (30 min) byl k roztoku přidán reaktivátor a celá směs byla inkubována po dobu 10 minut. Aktivita reaktivované AChE (a_r) byla opět odečtena ze závislosti spotřeby NaOH na čase.

Z naměřených hodnot aktivit bylo vypočítáno množství reaktivované AChE (%) podle vzorce:

$$x = \left(1 - \frac{a_0 - a_r}{a_0 - a_i} \right) \cdot 100 \quad [\%]$$

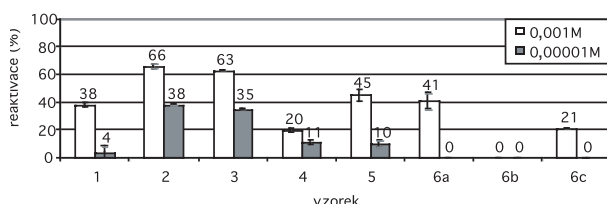
VÝSLEDKY A DISKUZE

Vypočítané hodnoty (%) reaktivace chlorpyrifosem a methylchlorpyrifosem inhibovanou AChE pro dvě rozdílné koncentrace reaktivátoru (10^{-3} a 10^{-5} M) jsou uvedeny v tabulce 1, vznikly aproximací tří nezávislých měření. Vztah mezi koncentrací a reaktivační účinností všech studovaných reaktivátorů vyjadřuje obrázek 1 a 2.

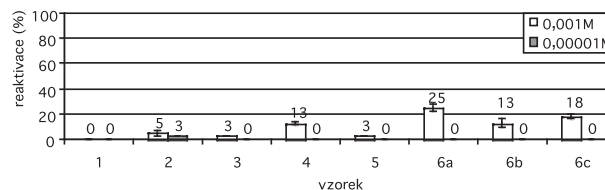
oxim HI-6 a nově připravené sloučeniny jsou při koncentraci 10^{-3} M schopny účinně reaktivovat methylchlorpyrifosem inhibovanou AChE. Oximy **6a** a **6c** převyšují při této koncentraci používané reaktivátory AChE. Při koncentraci použitelné *in vivo* (10^{-5} M) se však testované reaktivátory jeví jako neúčinné pro methylchlorpyrifosem inhibovanou AChE. V případě inhibitoru methylchlorpyrifosu jsou reaktivační aktivity studovaných oximů nízké a závislost mezi strukturou a aktivitou je problematické vysledovat²⁸⁾. Otázkou zůstává, proč relativně malá změna molekuly inhibitoru (zkrácení ethylo-

Tab. 1. Reaktivační účinnost použitých reaktivátorů vůči chlorpyrifosem a methylchlorpyrifosem inhibované AChE

Inhibitor reaktivátor	chlorpyrifos		methylchlorpyrifos	
	% (10^{-3} M)	% (10^{-5} M)	% (10^{-3} M)	% (10^{-5} M)
2-PAM (1)	38	4	0	0
TMB-4 (2)	66	38	5	3
obidoxim (3)	63	35	3	0
HI-6 (4)	20	11	13	0
MMC (5)	45	10	3	0
6a	41	0	25	0
6b	0	0	13	0
6c	21	0	18	0



Obr. 1. Reaktivační účinnost oximů vůči chlorpyrifosem inhibované AChE



Obr. 2. Reaktivační účinnost oximů vůči methylchlorpyrifosem inhibované AChE.

Reaktivační účinnost testovaných sloučenin závisí na struktuře OF inhibitoru²⁰⁻²²⁾. Nejúčinnějšími reaktivátory pro chlorpyrifosem inhibovanou AChE (obr. 1) se zdají být trimedoxim (2) a obidoxim (3) při koncentraci 10^{-3} M. Z nově připravených sloučenin vykazuje při této koncentraci dobrou reaktivační účinnost látka **6a**. Koncentrace 10^{-3} M však není vhodná pro testování *in vivo* vzhledem k toxickému účinku samotného reaktivátoru²³⁻²⁴⁾. Z tohoto důvodu je důležitější reaktivační aktivita při koncentraci 10^{-5} M, kde se jeví jako neúčinnější opět trimedoxim (2) a obidoxim (3). Žádný z nově připravených oximů nevykázal při této koncentraci schopnost reaktivovat chlorpyrifosem inhibovanou AChE. U reaktivátorů AChE lze vysledovat vztah mezi strukturou a jejich biologickou aktivitou, který závisí zejména na přítomnosti a počtu kvarterních dusíkových atomů v molekule, poloze a počtu hydroxyiminomethylových skupin a struktuře spojovacího řetězce mezi dvěma heteroaromatickými jádry²⁵⁻²⁷⁾.

Reaktivační aktivita oximů, tj. jejich schopnost reaktivovat OF-inhibovanou AChE, by měla přesahovat 10 %¹⁾. Z uvedených dat (obr. 2) je zřejmé, že pouze

vého řetězce chlorpyrifosu na methylový derivát methylchlorpyrifosu) vede k odlišnému účinku reaktivátorů za předpokladu, že mechanismus inhibice AChE zůstává stejný (schéma 2). Tato skutečnost bude podrobena dalšímu výzkumu.

ZÁVĚR

Závěrem lze shrnout, že nově připravené reaktivátory AChE převyšují reaktivátory v současnosti používané v případě methylchlorpyrifosem inhibované AChE při koncentraci 10^{-3} M, která však není použitelná pro *in vivo* experimenty. Při fyziologické koncentraci (10^{-5} M) jsou všechny testované sloučeniny pro methylchlorpyrifosem inhibovanou AChE prakticky neúčinné. Naopak reaktivátory v současnosti používané převyšují nově připravené látky v případě chlorpyrifosem inhibované AChE při obou koncentracích.

Naše výsledky potvrzují, že reaktivátory AChE

původně vyvinuté proti NPL nejsou ve všech případech účinnými reaktivátory AChE inhibované pesticidy. Stejných výsledků bylo dosaženo i pro jiné typy pesticidů¹⁶⁻¹⁷. Z tohoto důvodu je třeba připravit nové širokospektrální reaktivátory účinné jak proti NPL, tak proti pesticidům.

Práce mohla vzniknout díky podpoře GAUK formou grantu č. 126/2005/B-BIO/FaF a Ministerstva obrany ČR formou grantu č. ONVLAJEP20031.

LITERATURA

1. **Kuča, K., Cabal, J.:** Zprav. Voj. Farm., 2004; XIV, 13-16.
2. **Kassa, J.:** J. Toxicol. Clin. Toxicol., 2002; 40, 803-816.
3. **Ringman, J. M., Cummings, J. L.:** Expert. Opin. Investig. Drugs, 1999; 8, 463-471.
4. **Sungur, M., Guven, M.:** Crit. Care, 2001; 5, 211-215.
5. **Fabritius, K., Balasescu, M.:** Toxicol. Lett., 1996; 88, 211-214.
6. **Marrs, T. C.:** Pharmacol. Ther., 1993; 58, 51-66.
7. **Kuča, K., Patočka, J., Cabal, J.:** J. Appl. Biomed., 2003; 1, 207-211.
8. **Amitai, G., Moorad, D., Adani, R., Doctor, B. P.:** Biochem. Pharmacol., 1998; 56, 293-299.
9. **Betancourt, A. M., Carr, R. L.:** Toxicol. Sci., 2004; 77, 63-71.
10. **Taylor, P.:** The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. New York, McGraw Hill, 1996, s. 161-176.
11. **Wilson, I. B., Ginsburg, S., Meilisch, E. K.:** J. Am. Chem. Soc., 1955; 77, 4286-4291.
12. **Poziomek, E. J., Hackley, B. E., Steinberg, G. M.:** J. Org. Chem., 1958; 23, 714-717.
13. **Krejčová, G., Kassa, J.:** Toxicology, 2003; 185, 129-139.
14. **Kassa, J., Kunešová, G., Vachek, J. et al.:** Voj. Zdrav. Listy, 2004; LXXIII, 107-121.
15. **Kuča, K., Bielavský, J., Cabal, J., Bielavská, M.:** Tetrahedron Lett., 2003; 44, 3123-3125.
16. **Worek, F., Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P.:** Biochem. Pharmacol., 2004; 68, 2237-2248.
17. **Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, F. et al.:** Toxicol. Lett., 1999; 107, 233-239.
18. **Český Lékopis 2002 – Zkoumadla – Část I. (4.1.1.) – Jodobismutitan draselný RS.**
19. **Kim, T.-H., Kuča, K., Jun, D., Jung, Y.-S.:** Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005; 15, 2914-2917.
20. **Kuča, K., Kassa, J.:** J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 2003; 18, 529-535.
21. **Kuča, K., Patočka, J.:** J. Enzym. Inhib. Med. Chem., 2004; 19, 39-43.
22. **Kuča, K., Cabal, J.:** Čes a slov. farm., 2004; LIII, 93-95.
23. **Ševelová, L., Kuča, K., Krejčová, G., Vachek, J.:** J. Appl. Biomed., 2004; 2, 163-167.
24. **Cabal, J.; Kuča, K.; Kassa, J.:** Pharmacol. Toxicol., 2004; 95, 81-86.
25. **Musílek, K., Kuča, K., Jun, D. et al.:** Voj. Zdrav. Listy, 2005; 74, 184-185.
26. **Musílek, K., Kuča, K., Jun, D. et al.:** J. Enzym. Inhib. Med. Chem., 2005; 20, 409-415.
27. **Musílek, K., Kuča, K., Jun, D. et al.:** Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006; 16, 622-627.
28. **Musílek, K., Kuča, K., Jun, D. et al.:** Zprav. Voj. Farm., 2005; 15, 35-39.

Došlo 5. 1. 2006.

Přijato ke zveřejnění 23. 2. 2006.

Mgr. Kamil Musílek
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
e-mail: musilekk@faf.cuni.cz

Abstrakta z akcí ČFS v časopisu Česká a slovenská farmacie

Redakce časopisu Česká a slovenská farmacie nabízí možnost zveřejňovat limitované množství abstrakt z odborných akcí pořádaných Českou farmaceutickou společností, například sympozií, seminářů, pracovních dnů apod.

Jednotlivá abstrakta (písmo Courier New, velikost 12, řádkování 2), by neměla přesáhnout 1 rukopisnou stranu formátu A4.

Počet abstrakt předem dohodnou předsedové příslušných sekcí, které akce pořádají, případně osoby zodpovědné za akci s redakcí časopisu, která poskytne i bližší informace. Souhrny je možné po dohodě (sedlarova@greenplanet.cz) zveřejnit rovněž na internetových stránkách ČFS (www.cfs-cls.cz)

Kontakt:

doc. RNDr. Pavel Komárek, PhD., vedoucí redaktor, Katedra farmaceutické technologie a kontroly léčiv IPVZ
100 05 Praha 10, Ruská 85, e-mail: komarek@ipvz.cz, tel.: 271 019 278