

# 有限采样法估算麦考酚钠 药-时曲线下面积及其药动学

李纳<sup>1</sup>, 朱振峰<sup>1</sup>, 丰贵文<sup>2</sup>, 张俊<sup>1</sup>, 贾萌萌<sup>1</sup>, 左莉华<sup>1</sup>, 张晓坚<sup>1</sup>

(郑州大学第一附属医院 1.药学部;2.肾移植中心, 郑州 450052)

**摘要** **目的** 建立有限采样法估算霉酚酸(MPA)药-时曲线下面积的模型。**方法** 16例肾移植患者口服麦考酚钠肠溶片(EC-MPS)720 mg, q12 h, 分别于术后第4天、第7天服药前及服药后0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h采集静脉血样3 mL, 采用超高效液相色谱-紫外(UPLC-UV)分析方法测定MPA血浆浓度。以DAS 2.0版药动学软件进行药动学分析, MPA-AUC<sub>0-12 h</sub>按梯形法计算。用SPSS 17.0版软件进行多元线性逐步回归分析方法, 建立有限采样法多元回归模型, 并计算相关参数。**结果** 术后第4天和术后第7天MPA的主要药动学参数 $t_{1/2}$ 分别为(6.93±6.51), (8.18±5.06) h ( $P>0.05$ );  $C_{max}$ 分别为(10.10±6.44), (17.26±11.67) mg·L<sup>-1</sup> ( $P<0.05$ ); AUC<sub>0-12 h</sub>分别为(32.47±15.53), (41.88±18.30) mg·h·L<sup>-1</sup> ( $P<0.05$ )。观察到部分患者药-时曲线呈双峰, 在服药后4~12 h出现第二峰, 峰值较第一峰明显降低。发现任何单一时间点MPA血药浓度不能准确预测AUC<sub>0-12 h</sub>。采用多元线性逐步回归分析方法分析多个时间点MPA血药浓度与AUC<sub>0-12 h</sub>的相关性后, 综合考虑选择0, 4, 1.5, 8 h 4个时间点的MPA血药浓度来估算AUC<sub>0-12 h</sub>, 计算公式为AUC<sub>0-12 h</sub>=6.207+ $C_0$ ×6.881+ $C_4$ ×2.388+ $C_{1.5}$ ×0.541+ $C_8$ ×4.252 ( $r^2=0.888$ ), 其预测值与实测值有很好的相关性( $r^2=0.918$ ), 相对预测误差在可接受范围内。**结论** 该研究建立的4点采样法多元回归模型可较好的预测MPA-AUC<sub>0-12 h</sub>, 有利于进一步在临床上推广和应用, 从而提高麦考酚钠合理用药水平, 达到预测疗效和不良反应的目的。

**关键词** 麦考酚钠; 霉酚酸; 药动学; 有限采样法; 药-时曲线下面积

中图分类号 R979.5; R969

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2016)11-1177-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2016.11.005

## Limited Sampling Strategy for the Estimation of Mycophenolate Sodium Area Under Concentration-Time Curve and Pharmacokinetic Study

LI Na<sup>1</sup>, ZHU Zhenfeng<sup>1</sup>, FENG Guiwen<sup>2</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>, JIA Mengmeng<sup>1</sup>, ZUO Lihua<sup>1</sup>, ZHANG Xiaojian<sup>1</sup>  
(1. Department of Pharmacy; 2. Department of Renal Transplantation, the First Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**ABSTRACT** **Objective** To establish a model for estimating area under the concentration-time curve (AUC) of mycophenolic acid (MPA) by a limited sampling strategy. **Methods** Sixteen renal allograft recipients were treated with enteric coated mycophenolate sodium (EC-MPS) twice a day respectively. The blood samples were collected on postoperative days 4 and 7 before and 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h after EC-MPS oral administration. Ultra performance liquid chromatography-UV (UPLC-UV) method was employed to determine the plasma concentration of MPA. Pharmacokinetic parameters of MPA were calculated by DAS 2.0 software. Areas under curve over the period of 0 to 12 h (AUC<sub>0-12 h</sub>) were calculated by using linear trapezoidal rule. The limited sampling model and relevant parameters were established by multivariate linear stepwise regression analysis with SPSS 17.0. **Results** The main pharmacokinetic parameters on postoperative days 4 and 7 were as follows:  $t_{1/2}$  were (6.93±6.51) and (8.18±5.06) h ( $P>0.05$ );  $C_{max}$  were (10.10±6.44) and (17.26±11.67) mg·L<sup>-1</sup> ( $P<0.05$ ); AUC<sub>0-12 h</sub> were (32.47±15.53) and (41.88±18.30) mg·h·L<sup>-1</sup> ( $P<0.05$ ). Some patients' concentration-time curves were bimodal. The second peak appeared at 4~12 h after treatment and the peak obviously decreased compared with the first one. No single plasma concentration can accurately predict AUC<sub>0-12 h</sub>. After analyzing the correlation between multiple plasma concentrations of MPA and AUC<sub>0-12 h</sub> by the multivariate linear stepwise regression analysis method, we selected the 0, 4, 1.5, 8 h plasma concentrations of MPA to estimate AUC<sub>0-12 h</sub>. The computational formula was AUC<sub>0-12 h</sub>=6.207+ $C_0$ ×6.881+ $C_4$ ×2.388+ $C_{1.5}$ ×0.541+ $C_8$ ×4.252 ( $r^2=0.888$ ). The predicted value has a good correlation with the measured value ( $r^2=0.918$ ) and the relative prediction error was in the acceptable range. **Conclusion** The multivariate regression model of four points sampling method is a better predictor of MPA-AUC<sub>0-12 h</sub>. This simple method will be conducive to the further application and popularization in clinic, improve the rational use of mycophenolate sodium, and realize the purpose of curative effect and adverse reaction prediction.

**KEY WORDS** Mycophenolate sodium; Mycophenolic acid; Pharmacokinetics; Limited sampling strategy; Area under concentration-time curve

麦考酚钠肠溶片 (mycophenolate sodium enteric-coated tablets, EC-MPS) 是霉酚酸 (mycophenolic acid, MPA) 的钠盐制剂, 口服后在肠道直接释放出 MPA, 可降低胃肠道不良反应发生率<sup>[1]</sup>。MPA 药动学特征有明显个体差异, 服用相同剂量的药物, 不同患者间 MPA 血药浓度和血药浓度-时间曲线下面积 (area under concentration-time curve, AUC) 可相差 10 倍<sup>[2]</sup>。因此, 有必要对 MPA 进行血药浓度监测。由于 MPA 代谢中有肠肝循环现象, 其谷浓度 ( $C_0$ ) 和治疗效应的相关性差。MPA 免疫抑制效果及不良反应与其  $AUC_{0-12h}$  密切相关。常规测定一个完整的 12 h 给药间隔内的 AUC 值往往需要 9~12 个采血点, 试验成本高, 采样次数多, 患者难以接受。因此, 开发有限采样法, 利用 2~4 个取样点的血药浓度来估算 MPA- $AUC_{0-12h}$  有重要的临床应用价值。目前已有多项研究建立了服用霉酚酸酯 (mycophenolate mofetil, MMF) 后估算 MPA- $AUC_{0-12h}$  的模型, 但是针对 EC-MPS 的研究笔者较少见到。笔者在本实验中建立有限采样法估算 MPA 的 AUC 模型, 现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 研究资料** 在本院首次接受肾移植患者 16 例 (男 11 例, 女 5 例), 年龄 ( $29.06 \pm 8.53$ ) 岁, 体质量 ( $60.59 \pm 13.92$ ) kg。患者未同时服用含有镁和铝氢氧化物的抗酸药、考来烯胺等可能影响 EC-MPS 吸收及肠肝循环的药物; 无严重胃肠道疾病、无严重肝功能异常。在试验前所有患者均被告知试验目的和内容, 均签署知情同意书。研究方案获得郑州大学第一附属医院伦理委员会批准。

**1.2 免疫抑制治疗方案** 术后所有患者采用 EC-MPS、他克莫司及皮质类固醇激素预防排斥反应。术后第 1 天开始口服 EC-MPS 720 mg, q12 h。他克莫司起始剂量  $0.06 \sim 0.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 分 2 次空腹服用; 然后加用五酯软胶囊 0.5 g, bid。术前静脉滴注甲泼尼龙 120 mg 和抗胸腺细胞球蛋白 (antithymocyte globulin, ATG) 100 mg, 术中分两次静脉滴注甲泼尼龙共 1 g, 之后连续 2 d 静脉输注甲泼尼龙 500 mg, 第 3 天 375 mg, 第 4 天 250 mg, 第 5 天 120 mg, 之后改用口

服甲泼尼龙片  $16 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$  维持。

**1.3 仪器与试剂** Acquity 超高效液相色谱仪 (ultra performance liquid chromatography, UPLC, 美国 Waters 公司); 紫外线 (ultra-violet ray, UV) 光学检测器 (美国 Waters 公司); Vortex-genie2 漩涡混合器 (美国 Scientific Industries 公司); Sorvall Legend Micro17 微量高速离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BX7200HP 超声波清洗器 (上海新苗医疗器械制造有限公司)。

MPA 对照品 (含量: 99.5%, 美国 Sigma 公司, 批号: 011M4007V), 卡马西平对照品 (含量: 99.7%, 批号: 100142-201105, 中国食品药品检定研究院), 试验用水均为 Millipore 超纯水, 盐酸、磷酸均为色谱纯, 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 为分析纯, 乙腈、甲醇均为色谱纯 (美国 Tedia 公司)。

**1.4 血样采集方法** 患者服用 EC-MPS 达稳态后, 分别于术后第 4 天、第 7 天服药前及服药后 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h 采集静脉血样 3 mL, 置于乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 抗凝管中, 经  $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 ( $r=8.6 \text{ cm}$ ) 10 min 后取上层血浆, 置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱, 用于检测 MPA 浓度。

**1.5 血药浓度测定方法** 采用超高效液相色谱-紫外 (UPLC-UV) 分析方法测定血浆 MPA 浓度。取血浆 0.2 mL, 置于 1.5 mL EP 管中, 加入  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸 (HCl) 20  $\mu\text{L}$ , 振荡 1 min, 加入含内标卡马西平 ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的乙腈溶液 400  $\mu\text{L}$ , 涡旋振荡 2 min, 以  $133\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 吸取全部上清液置于 EP 管中, 氮气吹干。然后用 50% 甲醇溶液 100  $\mu\text{L}$  复溶, 涡旋振荡 2 min, 以  $133\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 min, 取上清液 10  $\mu\text{L}$  进样。色谱柱:  $\text{C}_{18}$  柱 ( $2.1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ ,  $1.7 \mu\text{m}$ ), 流动相: 乙腈-20 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液 = 30.5 : 69.5, 流速:  $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 紫外检测波长: 254 nm, 柱温:  $30^\circ\text{C}$ , 样品池温度:  $4^\circ\text{C}$ 。MPA 在  $0.20 \sim 50.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内线性良好。该方法经体内药物分析方法学指标验证均符合生物样品测定要求。

**1.6 数据处理与统计学方法** 以 DAS 2.0 版药动学软件进行药动学分析, MPA- $AUC_{0-12h}$  按梯形法计算。参数  $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$  均为实测值。采用配对  $t$  检验方法对术后第 4 天和术后第 7 天的药动学参数进行对比分析, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

用 SPSS 17.0 版软件进行多元线性逐步回归分析, 建立有限采样法多元回归模型, 并计算相关参数。以各个时间点血 MPA 浓度作为自变量, 以  $AUC_{0-12h}$  作为因变量, 考察  $AUC_{0-12h}$  与血 MPA 浓度任意一点或多

收稿日期 2015-08-03 修回日期 2015-10-12

作者简介 李纳 (1985-), 女, 河南安阳人, 主管药师, 硕士, 研究方向: 临床药学及药动学。电话: 0371-66913047, E-mail: lina03154312@126.com。

通信作者 朱振峰 (1963-), 男, 河北阜城人, 副研究员, 博士, 研究方向: 临床药学及 (群体) 药动学研究。电话: 0371-66913344, E-mail: zhenfeng1997@sina.com。

点间的相关性,并采用逐步多元回归方法,遴选出复相关系数( $r^2$ )较大、相对预测误差(relative prediction error,RPE)小的回归方程,用于估算 MPA-AUC<sub>0-12 h</sub>。RPE、相对预测误差绝对值(absolute relative prediction error,ARPE)、平均相对预测误差(mean relative prediction error,MRPE)计算如下:RPE(%)=(AUC 预测值-AUC 实测值)/AUC 实测值×100%,ARPE(%)=|RPE|,MRPE(%)= $\frac{1}{n}\sum RPE_i$ 。

2 结果

2.1 EP-MPS 药动力学结果 16 例患者口服 EP-MPS 720 mg,q12 h 多剂量给药后,血 MPA 浓度数据使用 DAS 2.0 版药动力学软件进行处理,计算药动力学参数,其中  $t_{max}$ 、 $C_{max}$  均为实测值。术后第 4 天和术后第 7 天  $C_{max}$ 、AUC<sub>0-12 h</sub>、MRT<sub>0-12 h</sub> 差异有统计学意义,而  $t_{1/2}$ 、 $t_{max}$ 、CL/F 差异无统计学意义(表 1)。

16 例患者术后第 4 天和第 7 天 MPA 平均药-时曲线形态有明显差异(图 1)。部分患者 AUC 呈双峰现象,第一峰出现在服药后 1~4 h,第二峰出现在服药后 4~12 h,峰值较第一峰明显降低。

2.2 多元回归模型的分析结果 先分析单个时间点 MPA 血药浓度与 AUC<sub>0-12 h</sub> 相关性,结果发现 0,8 h 单个时间点 MPA 血药浓度与 AUC<sub>0-12 h</sub> 相关性较好, $r^2$  分别为 0.699 和 0.553,MRPE 分别为 14.4%和 18.5%,但预测的精确性都不佳,都有 50%以上的预测值 ARPE 超过 15%(表 2)。任何单个时间点 MPA 血药浓度不能准确预测 AUC<sub>0-12 h</sub>。

采用多元线性逐步回归方法分析多个时间点 MPA 血药浓度与 AUC<sub>0-12 h</sub> 相关性,结果显示 2~6 个时间点 MPA 血药浓度所拟合的简化计算回归模型, $r^2$  明显高于单点拟合结果(表 2)。随着采样时间点增加,其建立的多元回归模型与 MPA-AUC<sub>0-12 h</sub> 相关性越好( $r^2$  越大,MRPE 越小)。但是增加采样时间点,采血次数多,成本较高,患者依从性较差,综合考虑以 2~4 个时间点 MPA 血药浓度来估算 AUC<sub>0-12 h</sub> 较为合适。0,

4 h 和 0,4,1.5 hMPA 血药浓度分别有 31.25%和 25%的 ARPE>15%,预测精度欠佳。0,4,1.5,8 h 的 MPA 血药浓度拟合效果较好,其  $r^2$  为 0.888,MRPE 为 4.78%,仅有 12.50%患者的 ARPE>15%,计算公式为  $Y=6.207+C_0\times6.881+C_4\times2.388+C_{1.5}\times0.541+C_8\times4.252$ 。用 4 点法估算的 AUC<sub>0-12 h</sub>(eAUC<sub>0-12 h</sub>)与实际测得的 AUC<sub>0-12 h</sub>(fAUC<sub>0-12 h</sub>)的相关性较好(图 2),可以准确预测 MPA-AUC<sub>0-12 h</sub>,同时 4 个采血点采样简单方便,患者易于接受。

3 讨论

环孢素可以影响 MPA 肠肝循环,降低 MPA 暴露量<sup>[3]</sup>,而他克莫司对 MPA 代谢影响较小。MPA 有限采样法的建立在与他克莫司或环孢素合并用药时有所不同。本研究主要探讨与他克莫司合用时,EC-MPS 有限采样方案的建立。多剂量服用 EC-MPS 术后 4 d 和术后 7 d 的  $t_{max}$  分别为 2.72 和 2.25 h,与 MMF( $t_{max}$  0.75 h)相比,达峰时间均延迟,符合肠溶片的吸收特点。部分患者服用 EC-MPS 后药-时曲线上 4~12 h,发现有明显的第 2 峰,可能与 MPA 的肠肝循环有关。患者术后第 4 天和术后第 7 天的 MPA 平均药-时曲线有明显差异,术后第 7 天 AUC<sub>0-12 h</sub> 和  $C_{max}$  均比术后第 4 天明显增高,表明 MPA 在体内存在蓄积现象。可能与术后前 4 天糖皮质激素的用量大有关,因为糖皮质激素能诱导 MPA 代谢相关的酶,从而降低 MPA 的体内暴露量<sup>[4]</sup>。

笔者在本研究发现,任一单个时间点 MPA 的血药浓度与 AUC<sub>0-12 h</sub> 相关度较差,不能准确预测 AUC<sub>0-12 h</sub>。证实仅通过测定  $C_0$  无法准确反映药物的暴露量、抗排斥反应强度及不良反应情况。通过多元线性逐步回归分析方法,笔者建立了有限采样法估算服用 EC-MPS 后 MPA-AUC<sub>0-12 h</sub> 简化计算公式,其中 0,4,1.5,8 h 4 个时间点 MPA 血药浓度拟合效果较好,预测值与实测值有很好的相关性,RPE 在可接受范围内。若采用 2 点或 3 点法,虽然可减少采样次数,但 RPE 较大。发现随着采样点的增多,建立的公式计算精度越高,RPE 也越小。但增加采样时间点后,采血次数多,采样时间

表 1 术后第 4 天和第 7 天 MPA 主要药动力学参数

Tab.1 Main pharmacokinetic parameters of MPA on the postoperative day 4 and day 7

$\bar{x}\pm s,n=16$

时间	$t_{1/2}$	$t_{max}$	$C_{max}$ /	CL/F	AUC <sub>0-12 h</sub> /	MRT <sub>0-12 h</sub> /
	h		(mg·L <sup>-1</sup> )	(L·h <sup>-1</sup> )	(mg·h·L <sup>-1</sup> )	h
术后第 4 天	6.93±6.51	2.72±1.66	10.10±6.44	24.91±22.73	32.47±15.53	4.81±1.20
术后第 7 天	8.18±5.06	2.25±2.44	17.26±11.67	15.01±8.84	41.88±18.30	4.09±1.09
<i>t</i>	0.804	0.771	3.024	2.037	2.482	2.528
<i>P</i>	0.434	0.453	0.009	0.06	0.025	0.023

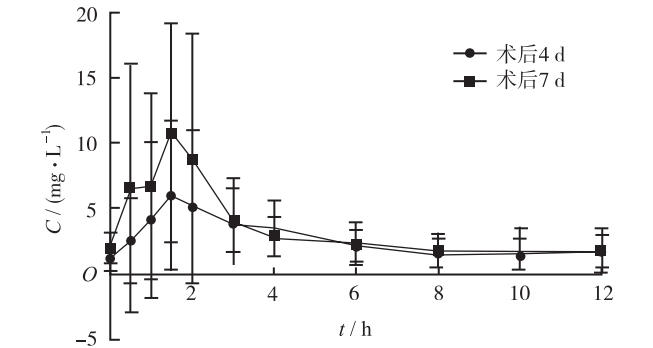


图1 术后第4天和第7天MPA平均药-时曲线( $\bar{x}\pm s, n=16$ )

Fig.1 Mean concentration-time curve of MPA on the postoperative day 4 and day 7 ( $\bar{x}\pm s, n=16$ )

表2 回归模型估算与实测MPA-AUC<sub>0-12h</sub>的相关性分析  
Tab.2 Correlation analysis of the estimated and factual measured MPA-AUC<sub>0-12h</sub> by regression model

采样时间/h	回归方程	$r^2$	MRPE/%	ARPE>15%的例数(%)
0	$Y=16.732+C_0\times12.449$	0.699	14.40	18(56.25)
0.5	$Y=32.247+C_{0.5}\times1.070$	0.202	31.04	22(68.75)
1	$Y=31.422+C_1\times1.042$	0.155	30.90	22(68.75)
1.5	$Y=28.228+C_{1.5}\times1.061$	0.210	28.08	25(78.13)
2	$Y=29.789+C_2\times1.049$	0.234	28.89	23(71.88)
3	$Y=21.984+C_3\times3.718$	0.383	22.35	22(68.75)
4	$Y=16.241+C_4\times6.462$	0.471	16.44	24(75.0)
6	$Y=25.968+C_6\times4.903$	0.165	31.56	24(75.0)
8	$Y=18.732+C_8\times10.637$	0.553	18.54	20(62.5)
10	$Y=24.446+C_{10}\times7.472$	0.410	22.73	20(62.5)
12	$Y=22.276+C_{12}\times8.225$	0.474	21.05	20(62.5)
0,4	$Y=9.521+C_0\times9.818+C_4\times3.559$	0.811	7.76	10(31.25)
0,4,1.5	$Y=7.523+C_0\times9.007+C_4\times3.432+C_{1.5}\times0.444$	0.843	5.83	8(25.0)
0,4,1.5,8	$Y=6.207+C_0\times6.881+C_4\times2.388+C_{1.5}\times0.541+C_8\times4.252$	0.888	4.78	4(12.50)
0,4,1.5,8,2	$Y=5.244+C_0\times5.240+C_4\times1.452+C_{1.5}\times0.468+C_8\times6.100+C_2\times0.582$	0.940	3.53	3(9.38)
0,4,1.5,8,2,0.5	$Y=4.517+C_0\times3.523+C_4\times1.925+C_{1.5}\times0.485+C_8\times5.741+C_2\times0.654+C_{0.5}\times0.431$	0.960	2.56	3(9.38)

较长,难以被患者接受。4点采样法已可较好预测MPA-AUC<sub>0-12h</sub>,有利于进一步在临床推广和应用,提高

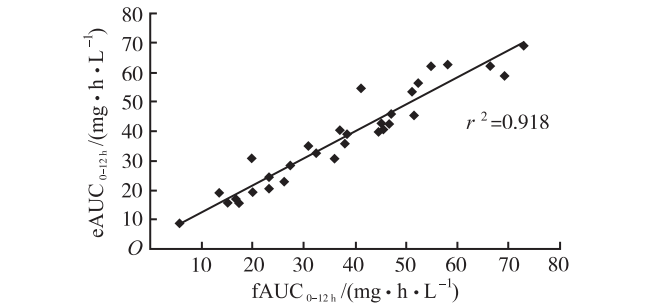


图2 4点法估算的药-时曲线下面积(eAUC<sub>0-12h</sub>)与实际测得的药-时曲线下面积(fAUC<sub>0-12h</sub>)的相关性关系图( $n=32$ )

Fig.2 Correlation of the estimation of AUC<sub>0-12h</sub> (eAUC<sub>0-12h</sub>) and factual measurement of AUC<sub>0-12h</sub> (fAUC<sub>0-12h</sub>) by four point method( $n=32$ )

合理用药水平,达到预测疗效和不良反应的目的。

笔者在本研究建立了合并使用他克莫司时估算MPA-AUC<sub>0-12h</sub>的简化计算公式。MPA药动学个体差异较大,有限采样法估算模型的建立需要按不同给药剂型、给药方案 and 不同人群做进一步的研究。2006年国际会议将MPA-AUC<sub>0-12h</sub>的目标范围界定为30~60 mg·h·L<sup>-1</sup><sup>[5]</sup>,这主要是基于西方人群的数据。此目标范围是否也适用于中国人群,有必要结合MPA-AUC<sub>0-12h</sub>与急性排斥反应和不良反应的关系进行更大样本的研究,以确定符合中国人群的MPA-AUC<sub>0-12h</sub>最佳目标范围。

参考文献

[1] BUDDE K, GLANDER P, DIEKMANN F, et al. Review of the immunosuppressant enteric-coated mycophenolate sodium[J]. Expert Opin Pharmacother, 2004, 5(6): 1333-1345.

[2] CIANCIO G, MILLER J, GONWA T A. Review of major clinical trials with mycophenolate mofetil in renal transplantation[J]. Transplantation, 2005, 80(2 Suppl): S191-200.

[3] 马一平. 实体器官移植患者霉酚酸的药动学特征及其影响因素[J]. 天津药学, 2011, 23(3): 52-55.

[4] CATTANEO D, PERICO N, GASPARI F, et al. Glucocorticoids interfere with mycophenolate mofetil bioavailability in kidney transplantation[J]. Kidney Int, 2002, 62(3): 1060-1067.

[5] LE MEUR Y, BORROWS R, PESCOVITZ M D, et al. Therapeutic drug monitoring of mycophenolates in kidney transplantation: report of the transplantation society consensus meeting[J]. Transplant Rev, 2011, 25(2): 58-64.