

І. Ю. Письменецька

ВПЛИВ ЛІКУВАННЯ НА ХРОМАТОГРАФІЧНІ СПЕКТРИ ВІЛЬНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ СЕРЦЕВУ НЕДОСТАТНІСТЬ

ДУ «Дніпропетровська медична академія», Дніпропетровськ, Україна

УДК 543.544.5.068.7:616.2

И. Ю. Письменецкая

ВЛИЯНИЕ ЛЕЧЕНИЯ НА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СПЕКТРЫ СВОБОДНЫХ ОЛИГОСАХАРИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

ГУ «Днепропетровская медицинская академия», Днепропетровск, Украина

Адаптивные и проапоптотные реакции кардиомиоцитов на стресс эндоплазматического ретикулума играют фундаментальную роль в развитии и прогрессировании сердечно-сосудистых заболеваний и в ближайшее время могут стать эффективными мишенями терапевтического воздействия. Данная работа посвящена исследованию хроматографических спектров перспективных плазматических маркеров состояния эндоплазматического ретикулума и лизосомно-эндосомной системы поврежденных клеток — свободных олигосахаридов — до и после лечения больных сердечной недостаточностью. Стандартная терапия отражается на динамике хроматографических спектров нейтральной фракции свободных олигосахаридов и не влияет на спектры заряженных гликанов. Тенденция сдвига профиля нейтральной фракции к стандартному спектру свидетельствует об улучшении состояния эндоплазматического ретикулума клеток, однако полного восстановления не происходит, т. к. концентрация маркерных пиков заболевания остается высокой и после проведенной терапии.

Ключевые слова: свободные олигосахариды, высокоэффективные жидкостные хроматографические спектры, плазма крови человека, терапия сердечной недостаточности.

UDC 543.544.5.068.7:616.2

I. Yu. Pismenetska

THE IMPACT OF TREATMENT ON PLASMA FREE OLIGOSACCHARIDES CHROMATOGRAPHIC PROFILES OF PATIENTS WITH CHRONIC CARDIAC FAILURE

SI "Dnipropetrovsk Medical Academy", Dnipropetrovsk, Ukraine

Adaptive and proapoptotic reactions of cardiomyocytes to stress of the endoplasmic reticulum play a fundamental role in the development and progression of cardiovascular diseases and in the nearest future may become effective therapeutic targets. Since the endoplasmic reticulum is the main source of free oligosaccharides (FOS) — unbound structural analogues of glycans of glycoconjugates, their structures can reflect a state of this cell organelle. Moreover, some fractions of FOS might represent a status of lysosomes and endosomes. FOS penetration from cells into blood and urine makes them prospective markers of cell stress in biological fluids.

The **objective** of the work was a characterization of FOS in blood plasma obtained from patients with cardiac failure before and after standard treatment. Chromatographic profiles of FOS composed of 4–12 monosaccharides were obtained and analyzed for quantitative and qualitative differences between the samples. After plasma deproteinization and FOS purification the oligosaccharides were labelled with anthranilic acid, separated into the neutral and charged with QAE Sephadex chromatography and analysed using high-performance liquid chromatography.

After treatment, the spectrum changes were observed in neutral fractions of FOS with the restoration of dominant concentrations of the same main peaks as in the control profile. The depth of these changes had individual features but a full profile recovery was not observed since the concentrations of the peaks marked the cardiac failure at this stage of the treatment were still significantly higher than in the control profile. There was no impact of the treatment on the charged fraction of FOS. That might indicate a stress prolongation of endosomal-lysosomal system in spite of the therapy. The study of FOS of blood plasma is a new field allowing an evaluation of an organism state at the level of the cell organelle functional status.

Key words: free oligosaccharides, HPLC-profiles, human plasma, therapy of cardiovascular diseases.

Вступ

Дослідження експресії генів на культурах клітин і моделях тварин свідчать про те, що адаптивні та проапоптотні

шляхи реакції кардіоміоцитів на стрес ендоплазматичного ретикулума відіграють фундаментальну роль у розвитку та прогресуванні серцево-судинних захворювань, у тому числі сер-

цевої недостатності, ішемічної хвороби серця й атеросклерозу та найближчим часом можуть стати ефективними мішенями терапевтичного впливу [1].



Коли занадто велика кількість неправильно згорнутих або розгорнутих білків нагромаджується в ендоплазматичному ретикулумі, три трансмембранних білки-сенсори їх ідентифікують й ініціюють так звану відповідь на незгорнуті білки (unfolded protein response, UPR). Білки-сенсори представлені протеїнкіназами IRE1 (inositol-requiring protein-1), PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase) і активатором фактора транскрипції ATF6 (activating transcription factor-6). N-кінці білків знаходяться у порожнині ендоплазматичного ретикулума, а C-кінці у цитозолі, тим самим поєднуючи ендоплазматичний ретикулум з цитозолем. За нормальних, не стресових умов порожнинні домени зв'язані з шапероном BiP/GRP78 (immunoglobulin-binding protein/78 kDa glucose-regulated protein) і знаходяться в неактивному стані.

Стресові фактори призводять до активації білків-сенсорів шляхом відокремлення від шаперону. Активовані білки запускають 3 каскади реакцій, що взаємодіють між собою і спрямовані на відновлення протеостазу. Це відбувається за рахунок пригнічення загального синтезу білків на тлі активації анаболізму тих із них, що задіяні у фолдингу й асоційованій з ендоплазматичним ретикулумом деградації ERAD (ER-associated degradation) протеїнів з аберантною конформацією [2; 3].

У разі неможливості відновити протеостаз вмикаються проапоптозні шляхи розвитку процесу, що призводить до загибелі клітин [4].

Водночас ERAD є одним з головних джерел так званих вільних олігосахаридів FOS (free oligosaccharides) — не зв'язаних з білками або ліпідами

структурних аналогів вуглеводної частини глікопротеїнів або гліколіпідів, їх біосинтетичних попередників і продуктів катаболізму. Вони також утворюються при синтезі глікану — попередника в процесі N-глікозилування білків в ендоплазматичному ретикулумі та розпаді зрілих глікокон'югатів у лізосомах [5]. Вільні олігосахариди потрапляють з клітин у кров та сечу і таким чином можуть бути рідинними маркерами процесів, що відбуваються в ендоплазматичному ретикулумі та лізосомно-ендосомній системі клітин [6].

Раніше нами [7] було показано, що порівняно з нормою при серцевій недостатності відбуваються характерні зміни хроматографічних спектрів вільних олігосахаридів плазми крові людини. Колективні дослідження китайських й американських учених на тваринних моделях виявили, що блокатори β -адренорецепторів саме через пригнічення механізмів клітинного стресу ендоплазматичного ретикулума поліпшують стан кардіоміоцитів хворих щурів [8].

Метою даної роботи було дослідити, чи позначається на хроматографічному спектрі вільних олігосахаридів плазми крові людини стандартне лікування хронічної серцевої недостатності.

Матеріали та методи дослідження

Плазма крові пацієнтів із хронічною серцевою недостатністю I та II ФК (за NYHA) і практично здорових донорів була відібрана в КУ «Дніпропетровська обласна клінічна лікарня імені І. І. Мечникова» відповідно до вимог наказу МОЗ України від 23.09.2009 р. № 690 про порядок проведення клінічних випробувань і люб'язно нада-

на для досліджень лікарем-кардіологом А. А. Мірошніченко. У групі хворих було 7 жінок і 3 чоловіки, що отримували терапію вперше. Зразки крові для аналізу відбирали до лікування та через 3 міс. після стабілізації клінічних показників, не раніше ніж через 5–6 міс. терапії (із застосуванням індивідуально підібраних інгібіторів АПФ, блокаторів β -адренорецепторів тривалого вивільнення, діуретиків, серцевих глікозидів і нітратів короткої дії). Середній вік пацієнтів становив (59,1 \pm 2,8) року, вік практично здорових донорів (n=15) відповідав віковій категорії хворих досліджуваних груп.

У роботі застосовували реактиви фірм VWR International та Sigma-Aldrich. Депротеїнізацію нативної плазми проводили шляхом осадження білків 10 % трихлороцтовою кислотою (ТХО) з подальшим центрифугуванням упродовж 10 хв при 3000 об/хв [7]. Залишки білків з плазми вилучали шляхом фільтрації за допомогою фільтра з гідрофільною поліфлуороетиленовою (PTFE) мембраною (Milllex-LH, 0.45 μ m, Millipore Corp., США) згідно з [6]. Для вилучення глюкози з біологічної рідини застосовували адсорбційну хроматографію на пористому графіті з використанням колонки PGC (Thermo Electron Corp., Runcorn, UK) на 1 мл (25 мг/мл) згідно з методикою [6]. Вільні олігосахариди маркували 2-амінобензойною (антраніловою) кислотою — 2-AA (Sigma-Poole, Dorset, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботі D. C. A. Neville et al. [9].

Очищення 2-AA-маркованих олігосахаридів проводили шляхом твердофазної екстракції на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2 (Applied Separations, США) [6]. Марковані



глікани поділяли на нейтральні та заряджені іонообмінною хроматографією на QAE-Sephadex (Q25-120) після нанесення їх на колонку та промивання Milli-Q™ H₂O шляхом елюції нейтральних гліканів оцтовою кислотою, а заряджених — амоній ацетатом згідно з D. C. A. Neville et al. [9].

Аналіз маркованих олігосахаридів проводили шляхом нормальнофазової високо-ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на хроматографі фірми Waters (Велика Британія) з колонкою 4.6x250-мм TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботах D. C. A. Neville et al. [9; 10] на обладнанні Інституту глікобіології (Оксфорд, Велика Британія). Хроматографічні піки характеризували у глюкозних одиницях (ГО) шляхом порівняння із глюкозними олігомерами частково гідролізованого декстрану як зовнішнього стандарту згідно з D. C. A. Neville et al. [9]. Для збору та обробки даних застосовували комп'ютерні програми Waters Millennium чи Waters Empower, Peak Time та Microsoft Office Excel 2003.

Результати дослідження та їх обговорення

У даній роботі вперше були отримані хроматографічні спектри загального пулу, нейтральних і заряджених (кислих) вільних олігосахаридів плазми крові хворих на хронічну серцеву недостатність I та II ФК (за NYHA) до і після лікування та проведено їх порівняння з нормою. Досліджували олігосахариди, що складаються з 4 і більше залишків моносахаридів, тому аналізу піддавалися хроматограми на часовому відрізку від 20 до 44 хв (нижня шкала), що відпо-

відає характеристикам піків від 4 до 12 ГО (верхня шкала).

На рис. 1–3 наведені хроматограми, що демонструють спектри вільних олігосахаридів плазми крові людини в нормі (див. рис. 1), при виявленні захворювання (див. рис. 2) і після його лікування (див. рис. 3). Нумерація піків на досліджуваних хроматограмах зазначена відповідно до їх нумерації на контрольному спектрі.

Характерні риси хроматограм вільних олігосахаридів плазми крові хворих на хронічну серцеву недостатність порівняно з нормою — це порушення загальної структури профілю шляхом підвищення його

гетерогенності за рахунок суттєвого перерозподілу концентрацій між піками, їх окремих компонентів і появи маркерних піків захворювання. Якщо у нормі (див. рис. 1, А, В) найбільшу концентрацію мають піки 2, 4, 6, 7, то у хворих суттєво збільшуються піки 8, 9, 10 (див. рис. 2, А). Тому було розраховано співвідношення концентрацій цих піків у всіх хроматограмах (табл. 1) загального пулу вільних олігосахаридів. У нормі головні піки (2, 4, 6, 7) становлять майже 84 % від загальної концентрації усіх обраних для розрахунків піків (2, 4, 6, 7, 8, 9, 10), до лікування — лише 53 %, а після лікування

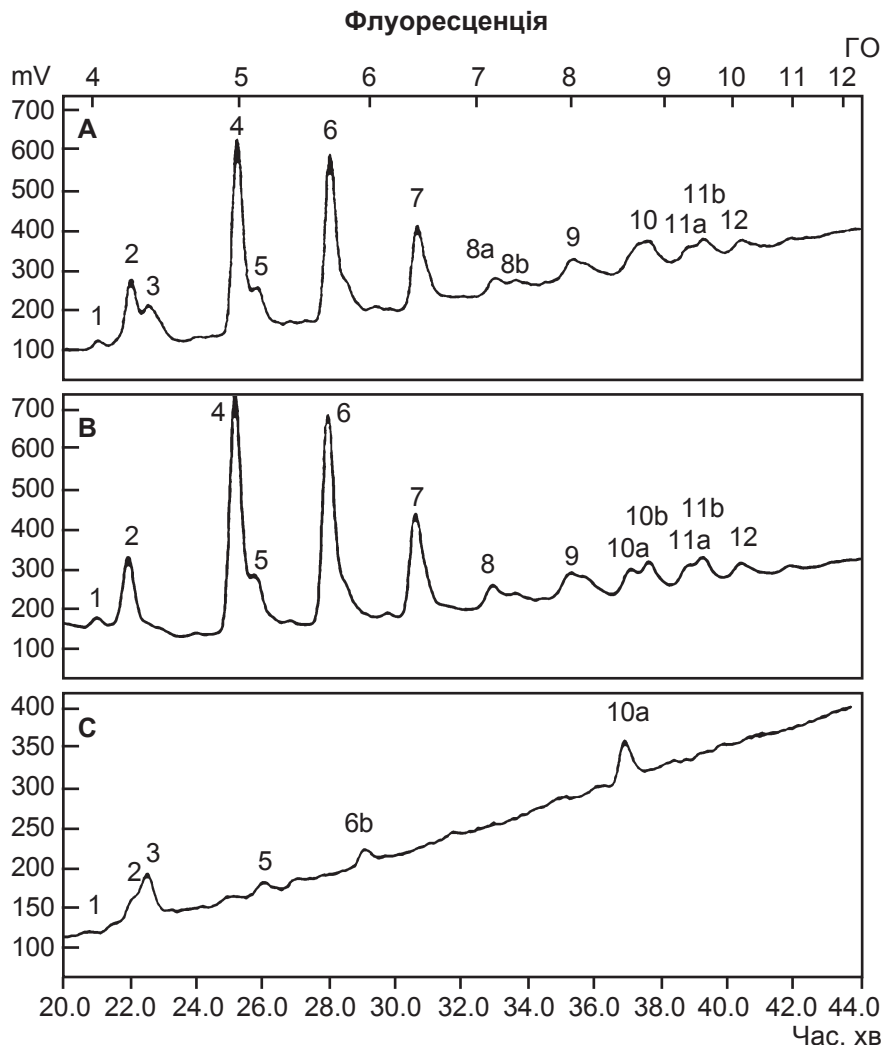


Рис. 1. Порівняння ВЕРХ-спектрів загального пулу (А), нейтральної (В) і зарядженої (С) фракцій вільних олігосахаридів плазми крові хворих на хронічну серцеву недостатність і практично здорових донорів (контроль)



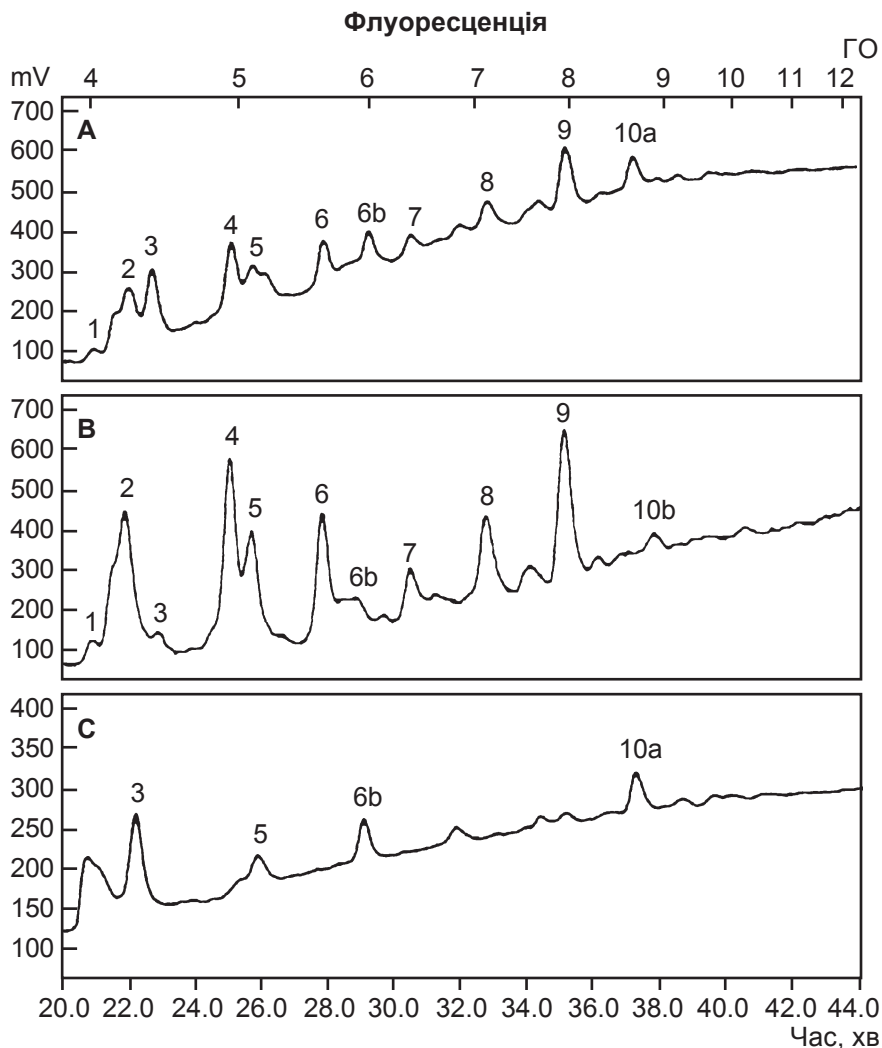


Рис. 2. Порівняння ВЕРХ-спектрів загального пулу (А), нейтральної (В) і зарядженої (С) фракцій вільних олігосахаридів плазми крові хворих на хронічну серцеву недостатність і практично здорових донорів (плазма хворого до лікування)

їх частка зростає, проте не досягає норми.

Водночас частка маркерних піків хронічної серцевої недостатності (8-го та 9-го) втричі більша, ніж у нормі, і значно зменшується при лікуванні. Аналогічна тенденція спостерігається для піків 8, 9 та 10-го. Найбільш контрастним є співвідношення середніх концентрацій маркерних піків захворювання (8 та 9 чи 8, 9, 10-го) до головних піків норми (2, 4, 6, 7-го).

Тенденції змін, що спостерігаються у загальному пулі вільних олігосахаридів, відтворюються у фракції нейтральних гліканів (див. рис. 1–3, В),

бо саме вона представлена більшою кількістю піків і становить основну частину загального пулу. Після лікування (див. рис. 3) спостерігаються зміни спектрів нейтральної фракції (В) у бік наближення профілів до нормального стану з відновленням домінуючої ролі 4, 6 та 7-го піків і відносного зменшення маркерних піків серцевої недостатності — 8-го та 9-го. Глибина цих змін має індивідуальний характер, але повного відновлення спектрів не спостерігається, бо концентрація 8-го та 9-го піків на цій стадії лікування ще значно перевищує норму. Істотною відмінністю зарядженої фракції

вільних олігосахаридів плазми крові хворих (див. рис. 2, С) від норми (див. рис. 1, С) полягає в різкому збільшенні концентрації 3-го піка та суттєвому підвищенні концентрації піка 10а. Застосоване лікування не відновлює спектра цієї фракції, що свідчить про подовження стресового стану лізосомно-ендосомної системи клітин.

Висновки

Стандартне лікування хворих на хронічну серцеву недостатність I та II ФК позначається на динаміці хроматографічних спектрів вільних олігосахаридів плазми крові. Суттєве наближення до стандартного спектра спостерігається у фракції нейтральних олігосахаридів, що свідчить про поліпшення стану ендоплазматичного ретикулума клітин, але повного відновлення не досягається, на що вказує збереження високої концентрації маркерних піків захворювання (8-го та 9-го). Лікування не впливає на спектр зарядженої фракції вільних олігосахаридів плазми крові, тобто на цій стадії його застосування ще не відновлюється стан лізосомно-ендосомної системи клітин.

Подяка

Роботу було виконано при підтримці міжнародного гранту EMBO (ASTF201-2010) та Інституту глікобіології Оксфордського університету (Оксфорд, Велика Британія) у лабораторії доктора Террі Д. Баттерса (Terry D. Butters).

ЛІТЕРАТУРА

1. Minamino T. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease / T. Minamino, I. Komuro, M. Kitakaze // *Circ Res.* – 2010. – Vol. 107 (9). – P. 1071–1082.
2. Guo X. F. Endoplasmic reticulum stress response in spontaneously hy-



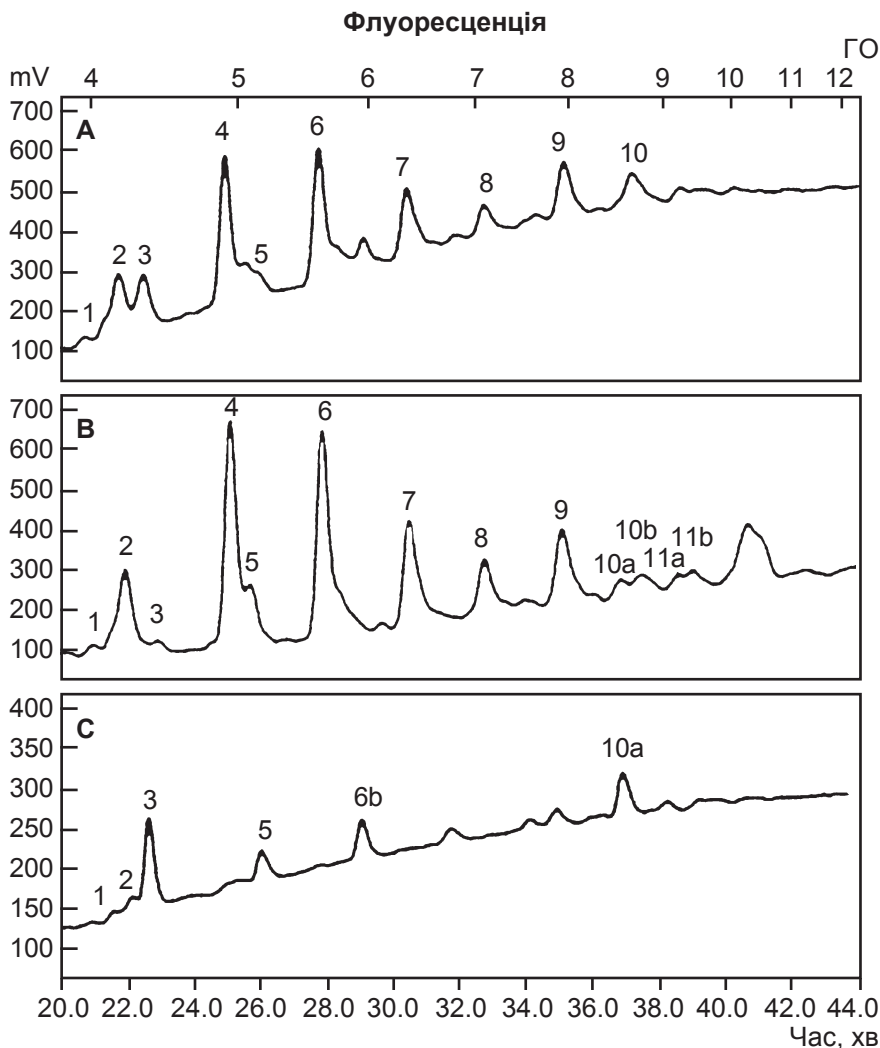


Рис. 3. Порівняння ВЕРХ-спектрів загального пулу (А), нейтральної (В) і зарядженої (С) фракцій вільних олігосахаридів плазми крові хворих на хронічну серцеву недостатність і практично здорових донорів (плазма хворого після лікування)

Таблиця 1

Співвідношення середніх концентрацій головних піків, %

Номери піків	До лікування	Після лікування	У нормі
2, 4, 6, 7 / 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10	53,29	74,99	83,96
8, 9 / 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10	33,83	16,87	10,95
8, 9, 10 / 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10	46,71	25,01	19,88
8, 9 / 2, 4, 6, 7	63,48	22,49	13,05
8, 9, 10 / 2, 4, 6, 7	87,64	33,36	23,68

pertensive rats is affected by myocardial ischemia reperfusion injury / X. F. Guo, X. J. Yang // *Exp Ther Med.* – 2015. – Vol. 9 (2). – P. 319–326.

3. *Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart* / J. Groenendyk, P. K. Sreenivasaiah, H. Kim do [et al.] // *Circ Res.* – 2010. – Vol. 107 (10). – P. 1185–1197.

4. *Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases* / Y. Mei, M. D. Thompson, R. A. Cohen, X. Tong

// *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – Vol. 1852 (2). – P. 243–251.

5. *Eukaryotic oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides during N-glycosylation* / Y. Harada, R. Buser, E. M. Ngwa [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, № 45. – P. 32673–32684.

6. *Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic — reticulum alpha-glucosidase inhibition* / D. S. Alonzi, D. C. Neville, R. H. Lach-

man [et al.] // *Biochem J.* – 2008. – Vol. 409, № 2. – P. 571–580.

7. *Письменецкая И. Ю. Хроматографические спектры свободных олигосахаридов плазмы крови больных с сердечно-сосудистой недостаточностью* / И. Ю. Письменецкая, Т. Д. Баттерс // *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина.* – 2015. – № 6 (1). – С. 51–56.

8. *β -AR Blockers Suppresses ER Stress in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure* / L. Ni, C. Zhou, Q. Duan [et al.] // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6, № 11. – e27294.doi:10.1371.

9. *Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling* / D. C. Neville, V. Coquard, D. A. Priestman [et al.] // *Anal Biochem.* – 2004. – Vol. 331. – P. 275–282.

10. *Neville D. C. Development of a single column method for the separation of lipid — and protein-derived oligosaccharides* / D. C. Neville, R. A. Dwek, T. D. Butters // *J. Proteome Res.* – 2009. – Vol. 8. – P. 681–687.

REFERENCES

1. Minamino T., Komuro I., Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2010; 107 (9): 1071–1082.

2. Guo X. F., Yang X. J. Endoplasmic reticulum stress response in spontaneously hypertensive rats is affected by myocardial ischemia reperfusion injury. *Exp Ther Med.* 2015; 9 (2): 319–326.

3. Groenendyk J., Sreenivasaiah P.K., Kim do H., Agellon L.B., Michalak M. Biology of endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ. Res.* 2010; 107 (10): 1185–1197.

4. Mei Y., Thompson M.D., Cohen R.A., Tong X. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852 (2): 243–251.

5. Harada Y., Buser R., Ngwa E.M., Hirayama H., Aebi M., Suzuki T. Eukaryotic oligosaccharyltransferase generates free oligosaccharides during N-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 2013; 288 (45): 32673–32684.

6. Alonzi D.S., Neville D.C., Lachman R.H., Dwek R.A., Butters T.D. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic — reticulum alpha-glucosidase inhibition. *Biochem. J.* 2008; 409 (2): 571–580.



7. Pismenetskaya I.Yu., Butters T.D. Chromatographic profiles of blood plasma free oligosaccharides of patients with cardiovascular disease. *Visnyk of Dnipropetrovskogo Universitetu. Biologiya, meditsina* 2015; 6 (1): 51-56.

8. Ni L., Zhou C., Duan Q., Lv J., Fu X., Xia Y., Wang D.W. b-AR Blockers Suppresses ER Stress in Cardiac

Hypertrophy and Heart Failure. *PLoS ONE* 2011;6 (11): e27294.doi:10.1371.

9. Neville D.C., Coquard V., Priestman D.A., te Vruchte D.J., Sillence D.J., Dwek R.A., Platt F.M., Butters T.D. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling. *Anal Biochem* 2004; 331: 275-282.

10. Neville D.C., Dwek R.A., Butters T.D. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides. *J. Proteome Res.* 2009; 8: 681-687.

Надійшла 20.06.2015
Рецензент д-р мед. наук,
проф. С. А. Тихонова

УДК 616.311.2+616.316.17+616.314.19)-002-053.81-06:614.546-004.2]-07:616.839-07

М. Т. Слобода

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ВЕГЕТАТИВНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ ПРИ УРАЖЕННЯХ ТКАНИН ПАРОДОНТА В ОСІБ МОЛОДОГО ВІКУ З ДЕФОРМУЮЧИМИ ДОРСОПАТІЯМИ

Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького, Львів, Україна

УДК 616.311.2+616.316.17+616.314.19)-002-053.81-06:614.546-004.2]-07:616.839-07

М. Т. Слобода

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВЕГЕТАТИВНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ПОРАЖЕНИЯХ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА У ЛИЦ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА С ДЕФОРМИРУЮЩИМИ ДОРСОПАТИЯМИ

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Львов, Украина

Проведено исследование вегетативной нервной системы по опроснику Вейна и индексам Кердо и Хильдебранта у 104 пациентов молодого возраста с заболеваниями пародонта на фоне деформирующих дорсопатий, 94 — с деформирующими дорсопатиями и клинически здоровыми тканями пародонта и 123 — с болезнями пародонта без поражений позвоночника. Установлено, что деформирующие дорсопатии у пациентов молодого возраста создают преморбидный фон для увеличения проявлений вегетативно-сосудистой дистонии, повышения симпатического тонуса и существенного отклонения в деятельности сердечно-сосудистой и дыхательной систем, связанных с преобладанием симпатических влияний.

Ключевые слова: лица молодого возраста, заболевания пародонта, деформирующие дорсопатии, вегетативная нервная система.

UDC 616.311.2+616.316.17+616.314.19)-002-053.81-06:614.546-004.2]-07:616.839-07

М. Т. Sloboda

RESULTS OF THE STUDY PARAMETERS OF THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM IN PERIODONTAL LESIONS IN YOUNG PEOPLE WITH DEFORMING DORSOPATHIES

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Abstract. Periodontal diseases and their prevalence in young age are actual problems in dentistry. Lesion of periodontal disease with spine condition makes this issue more important, especially in young people, who often have dorsopathies.

Influence of autonomic nerve structures in the development of diseases of periodontal tissues is known. Therefore it is necessary to study the functional state of the autonomic nervous system in young patients with periodontal diseases and deforming dorsopathies.

The aim of study is the condition of the autonomic nervous system in young patients with periodontal diseases and deforming dorsopathies based on questionnaire Wayne and index Kerdo and Hildebrant.

Materials and methods. Dental examination was held in 321 people aged 19–24 years, first group consisted of 104 patients with periodontal diseases and deforming dorsopathies, second group — 94 patients with deforming dorsopathies and clinically healthy periodontal tissues, third group — 123 patients with periodontal diseases without deforming dorsopathies.

Dysfunction of autonomic nervous system was determined by using Wayne questionnaire, autonomic tone — index Kerdo, degree of harmonization in the cardiovascular and respiratory systems — the Hildebrant coefficient.

