

UPORABA BIOMARKERJEV ZA DOLOČANJE VPLIVOV NANODELCEV

THE USE OF BIOMARKERS FOR ASSESSING EFFECTS OF NANOPARTICLES

Anita Jemec¹, Damjana Drobne², Kristina Sepčič², Tatjana Tišler¹

Prispelo: 20. 6. 2007 – Sprejeto: 17. 9. 2007

Pregledni znanstveni članek
UDK 577.1:615

Izvleček

V zadnjem desetletju smo priča izrednemu napredku nanotehnologij, ki so nam in nam bodo v prihodnosti prinesle celo vrsto pridobitev za vsakdanje življenje. Poleg tega pa se moramo zavedati dejstva, da se bodo v našem okolju v velikih količinah pojavljali novi nanomateriali (velikost vsaj 1-100 nm v eni dimenziji), ki imajo zaradi majhnosti drugačne fizikalno-kemijske in toksikološke lastnosti kot njihove večje oblike. O vplivih teh materialov na ljudi in okolje vemo zelo malo, zato je potrebno raziskati njihove morebitne vplive na različnih ravneh biološke organizacije. V prispevku smo predstavili testni sistem z mokrico *Porcellio scaber* za proučevanje vplivov nanomaterialov na organizme. Pri živalih, izpostavljenih 15 nm nanodelcem titanovega dioksida (TiO_2), smo opazovali biokemijske biomarkerje, tj. aktivnosti encimov glutation S-transferaze in katalaze, ter fiziološke biomarkerje (stopnja prehranjevanja, iztrebljanje, asimilacijska učinkovitost, sprememba mase živali). Opazili smo manjše vplive TiO_2 na stopnjo prehranjevanja mokric in signifikantne spremembe aktivnosti obeh encimov. Menimo, da je predstavljeni pristop testiranja hiter in ponovljiv ter nudi veliko informacij o mehanizmih delovanja nekega nanomateriala. Priporočamo nadaljnje nano(eko)toksikološke študije, ki nam bodo omogočile uporabo nanomaterialov s čim manjšimi posledicami za človeka in naše okolje.

Ključne besede: nanomateriali, titanov dioksid, biokemijski biomarkerji, prehranjevanje, kopenski rak *Porcellio scaber*

Review article
UDC 577.1:615

Abstract

During the last decade, an enormous development of nanotechnologies has resulted in numerous improvements for our everyday lives. Nanomaterials (size at least 1-100 nm in one dimension) are new chemical forms of common chemical elements and exhibit unique physico-chemical and toxicological properties that may differ greatly from those of larger particles of the same materials. Until now, not many studies have focused on the effects of nanomaterials on humans and environment, so it is important to investigate their effects at several levels of organization. This paper presents our test system using terrestrial isopod *Porcellio scaber* as a model organism for the evaluation of the nanomaterials' effects on organisms. Animals were exposed to 15 nm titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles, and afterwards biochemical biomarkers, e.g. the activities of glutathione S-transferase and catalase, and physiological end-points (feeding rate, faeces production, food assimilation efficiency and animal mass change) were evaluated. An insignificant effect of TiO_2 on feeding and significant effects on the activities of both enzymes were noticed. The test system presented in this work proved to be quick, reliable and

¹ Kemijski inštitut Ljubljana, Hajdrihova 19, 1000 Ljubljana

² Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

Kontaktni naslov: e-pošta: anita.jemec@ki.si

very informative. Further nano(eco)toxicological studies are recommended to enable the safe use of new nanomaterials.

Key words: nanomaterials, titanium dioxide, biochemical biomarkers, feeding, terrestrial isopod *Porcellio scaber*

1 Uvod

Smo v obdobju izredno razvijajočega se področja nanotehnologije, t.j. tehnološkega razvoja v nanometrskem merilu, ali po eni izmed prvih definicij: »the design, characterisation, production and application of structures, devices, and systems by controlling shape and size at nanometre scale« (»načrtovanje, določanje lastnosti, produkcija in uporaba struktur, sredstev in sistemov s kontrolo oblike in velikosti v nanometrskem merilu«) (1). Po mnogih napovedih bo imela izreden vpliv na industrijo, zdravstvo, proizvodnjo hrane in kozmetike, medicino, transport, energijo ter informacijske in komunikacijske tehnologije (2). Nekateri njen potencial primerjajo z industrijsko revolucijo in z odkritjem elektrike in komunikacijskih tehnologij (3). Produkti nanotehnologije so nanomateriali (tj. materiali, ki imajo vsaj eno dimenzijo v območju 1-100 nm) in so različnih oblik, npr. nanodelci, cevke, filmi in površine. Zaradi izredne majhnosti imajo popolnoma drugačne fizikalno-kemijske lastnosti kot njihove večje oblike, zato jih v mnogih ozirih lahko obravnavamo kot nove kemikalije. Slednje pomeni, da imajo tudi drugačne toksikološke lastnosti od znanih kemikalij, zato njihov morebitni vpliv na ljudi in okolje v veliki meri ni znan. Veliko nanomaterialov se že danes uporablja v vsakdanjem življenju (npr. v sončnih kremah, kozmetičnih proizvodih, materialih s samočistilno sposobnostjo, barvah, senzorjih za detekcijo onesnaževal, čiščenju onesnaženja vod in tal, ...), zato so študije o njihovih toksikoloških vplivih nujno potrebne (1). Kot predlagajo mnogi avtorji, mora toksikologija usmerjati pot nanotehnologiji (4).

V prispevku predstavljamo naš pristop k študiju mehanizma toksičnega delovanja nanomaterialov. Kot modelni organizem proučujemo kopenskega enakonožnega raka mokrico (*Porcellio scaber*). Le-ta ima pomembno vlogo v talni favni, in sicer so začetni dekompozitorji organskega materiala, pri čemer mehansko razgradijo material in ga pripravijo za nadaljno mikrobnost. Naseljujejo se v bližini človeških bivališč in so primeren indikatorski organizem za onesnaženje tal (5). Prednost študij z mokrico je v tem, da zaradi večletnih izkušenj dela z njim zelo dobro

poznamo njegove odzive na različne fiziološke in kemijske stresne dejavnike. To nam omogoča t.i. »primerjalni pristop« k ovrednotenju delovanja neke neznane kemikalije/nanomateriala s primerjanjem delovanja znane kemikalije.

Zaradi velike kompleksnosti naravnega sistema je za najbolj stvarno oceno potrebno proučiti spremembe na več različnih ravneh biološke organizacije. Pri tem se ocenjujejo t.i. biomarkerji, ki so merilo biološkega odziva na izpostavljenost in/ali učinek okoljskemu stresorju na suborganizemski (molekularni, biokemijski) stopnji in na ravni organizma (6). Biokemijski biomarkerji so velikokrat bolj občutljivi in specifični kazalci izpostavljenosti in učinka kemikalij kot odzivi na višjih ravneh biološke organizacije, npr. smrtnost. V našem laboratoriju smo kot dodatek standardnim testom optimizirali metode za merjenje dveh biokemijskih biomarkerjev, glutation S-transferaze (GST) in katalaze (CAT). Omenjena encima sta del skupine antioksidativnih encimov, ki v celici sodelujejo pri uravnavanju ravnovesja med oksidanti in antioksidanti. To se namreč lahko poruši, če v celico vstopijo kovine ali ksenobiotiki (7). Katalaza odstranjuje presežke nastalega vodikovega peroksida, GST pa odstranjuje produkte poškodovanih lipidov in veže ksenobiotike, ki so vstopili v celico. Poleg GST in CAT pri uravnavanju ravnovesja reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) sodelujejo tudi drugi encimi, vendar pa smo se za omenjena dva odločili zato, ker sta zelo razširjena, tako med prokarioti kot evkarioti. Poleg tega se je na osnovi naših predhodnih izkušenj izkazalo, da je njuno merjenje enostavnejše kot določanje drugih biokemijskih biomarkerjev, npr. glutaciona in glutation peroksidaze.

Izbrana biokemijska biomarkerja sta primerna za proučevanje vplivov nanomaterialov, ker naj bi le ti zaradi izredne površinske reaktivnosti pozročali nastanek ROS (8,9). Predlaganih je bilo več mehanizmov nastanka ROS na površini nanomaterialov, med njimi npr. ob indukciji z UV, poškodbi nanomaterialov in reakcijami ovojev delcev z okolico (10). Vodikov peroksid je eden izmed ROS, ki nastane kot rezultat nastanka drugih kisikovih radikalov, ki primarno nastanejo zaradi TiO_2 , npr. superoksidnega radikala in hidroksilnega radikala. Na ravni organizma

smo spremljali prehranjevanje, in sicer stopnjo hranjenja, stopnjo iztrebljanja, asimilacijsko učinkovitost ter spremembo mase živali.

Proučevali smo vplive nanodelcev titanovega dioksida (TiO_2 , 15 nm). Titanov dioksid se že nekaj desetletij uporablja v pigmentih in kozmetiki, vendar so bile prve toksikološke študije o vplivih različnih velikosti teh delcev na pljučno tkivo objavljene šele leta 1990 (11). Te študije so med prvimi pokazale, da je poleg vrste kemikalije pri strupenosti pomembna tudi velikost delcev. O strupenih vplivih nanodelcev TiO_2 je bilo objavljenih kar nekaj študij, vendar pa je bila velika večina opravljenih na celičnih kulturah pljučnih tkiv glodalcev, večinoma podgan (11, 12). Znano je, da nanodelci TiO_2 povzročajo nastanek ROS, vendar pa mehanizem nastanka v teh študijah ni bil raziskan. Ob stiku nanodelcev TiO_2 z UV je nastanek ROS večji, vendar pa le ti nastanejo tudi brez prisotnosti UV (13). Nanodelci naj bi bili v telo sposobni prehajati tudi preko prebavne cevi (14), zato je prehranjevalni poskus z izopodnim kopenskim rakom primeren testni sistem za toksikološke študije nanodelcev. Poleg tega pa je potrebno omeniti, da s stališča varovanja okolja vemo zelo malo o vplivih nanodelcev na kopenske in vodne organizme. Pred kratkim je bilo objavljenih le nekaj raziskav o vplivih na vodne organizme (15, 16).

2 Metode

2.1 Priprava testne suspenzije TiO_2

Uporabili smo komercialno dostopni TiO_2 z velikostjo delcev 15 nm, tipa anataza in s povprečno površino delca 200–220 m^2/g (kataloška številka sigma 637254). Nanodelce smo zatehtali in dodali v destilirano vodo. Suspenzije nismo sonicirali, kot je to priporočeno za nanodelce v vodni suspenziji, ker smo v preliminarni študiji ugotovili, da s tem procesom še dodatno pospešimo agregacijo delcev.

2.2 Prehranjevalna študija

V poskusih smo uporabili odrasle živali obeh spolov, ki smo jih nabrali na neonesnaženem kraju v Lukovici pri Domžalah in gojili v laboratoriju do začetka poskusov. V poskusih smo izbrali kontrolno in testno populacijo, ki sta bili primerljivi po spolu, masi in levitvi organizmov. Poleg tega smo na osnovi naših predhodnih raziskav prepričani, da te lastnosti živali ne vplivajo na aktivnost testiranih encimov.

Predhodno smo herbarizirali liste leske (*Corylis avellana*), jih stehtali in navlažili zaradi lažje aplikacije nanodelcev. Suspenzijo TiO_2 smo nanесли na liste po standardnem postopku, ki ga uporabljamo v našem laboratoriju (17). Suspenzijo smo odpipetirali na spodnjo stran lista in jo s čopičem enakomerno porazdelili po celotni površini. Na ta način smo zagotovili homogenost nanosa testne snovi na liste. Tak način aplikacije je v preteklosti pokazal, da so dejanske izmerjene koncentracije nanešene kemikalije (npr. kovine) enake tistim, ki smo jih prvotno želeli nanesti. Po nanosu TiO_2 smo liste sušili en dan in suhe ponudili živalim

Pripravili smo kontrolo in 3 različne koncentracije TiO_2 (1000, 2000 in 3000 $\mu\text{g TiO}_2/\text{g}$ lista). Te koncentracije smo izbrali na osnovi preliminarnih študij, kjer se je izkazalo, da imajo nižje koncentracije (1000 $\mu\text{g TiO}_2/\text{g}$ lista) po 14 dneh izpostavljanja že učinek na iste encime v izopodnem raku. Zato smo v 3 dnevni poskusih testirali višje koncentracije. Za vsako koncentracijo smo izpostavili 10 živali, in celoten poskus trikrat ločeno ponovili. Ves čas poskusa smo vzdrževali primerno vlažnost v testnem sistemu.

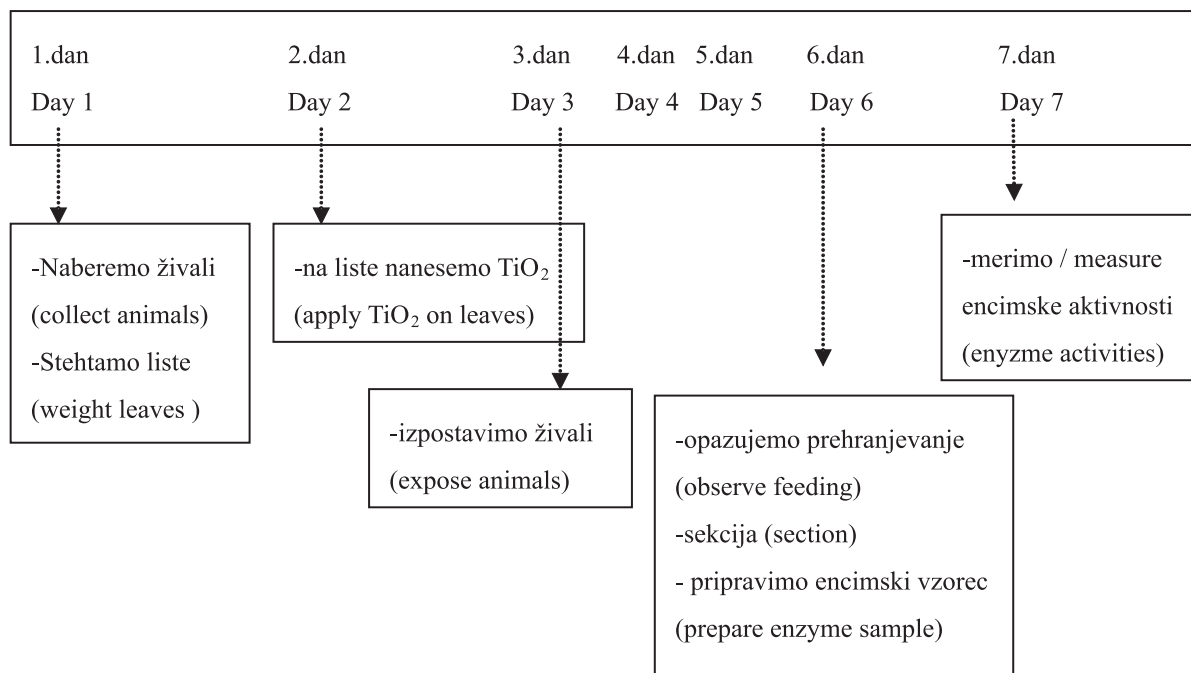
Po 3 dneh smo prešteli število iztrebkov in jih po 3-dnevnem sušenju v eksikatorju stehtali. Stehtali smo maso listov in živali. Iz dobljenih podatkov smo izračunali maso zaužitega lista, maso iztrebljene hrane in iz razlike teh dveh parametrov določili asimilacijsko učinkovitost, tj. koliko hrane je žival asimilirala. Živali smo secirali in izolirali prebavno žlezo, iz katere smo pripravili vzorec za encimske analize (Slika 1).

Kot referenca za dobro opravljen poskus in ustrezno populacijo testiranih živali so nam služile kontrolne vrednosti biomarkerjev po koncu poskusa, ki smo jih primerjali z že znanimi vrednostmi, ki smo jih v preteklosti dobili za zdravo populacijo živali. Tako smo zagotovili, da je bila testirana populacija primerna za uporabo v testu, in da je bil poskus izveden korektno.

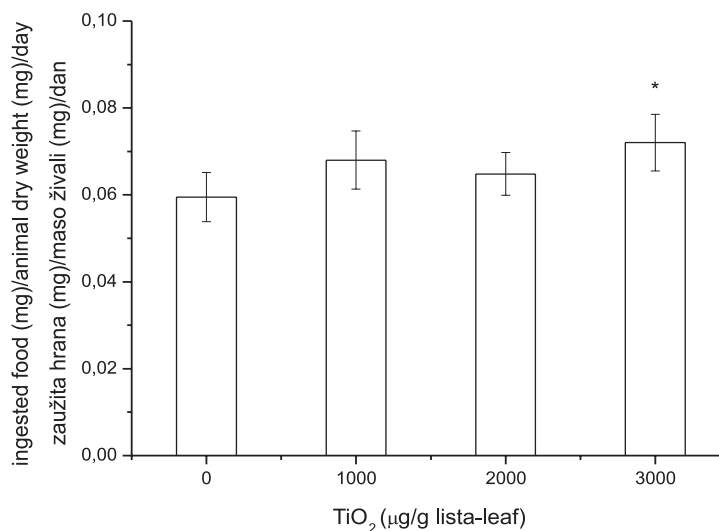
2.3 Merjenje encimskih aktivnosti

Prebavno žlezo smo s steklenim Elvehjem-Potterjevim homogenizerjem 3 minute homogenizirali v 0,8 mL 50 mM kalijevega fosfatnega pufru pH 7.0. Vzorce smo centrifugirali 25 min pri obratih 15000 g in temperaturi 4 °C. Aktivnosti encimov smo merili v sveže pripravljenih vzorcih.

Aktivnost GST smo določali z 1-kloro-2,4-dinitrobenzenom (CDNB) kot substratom (18) s

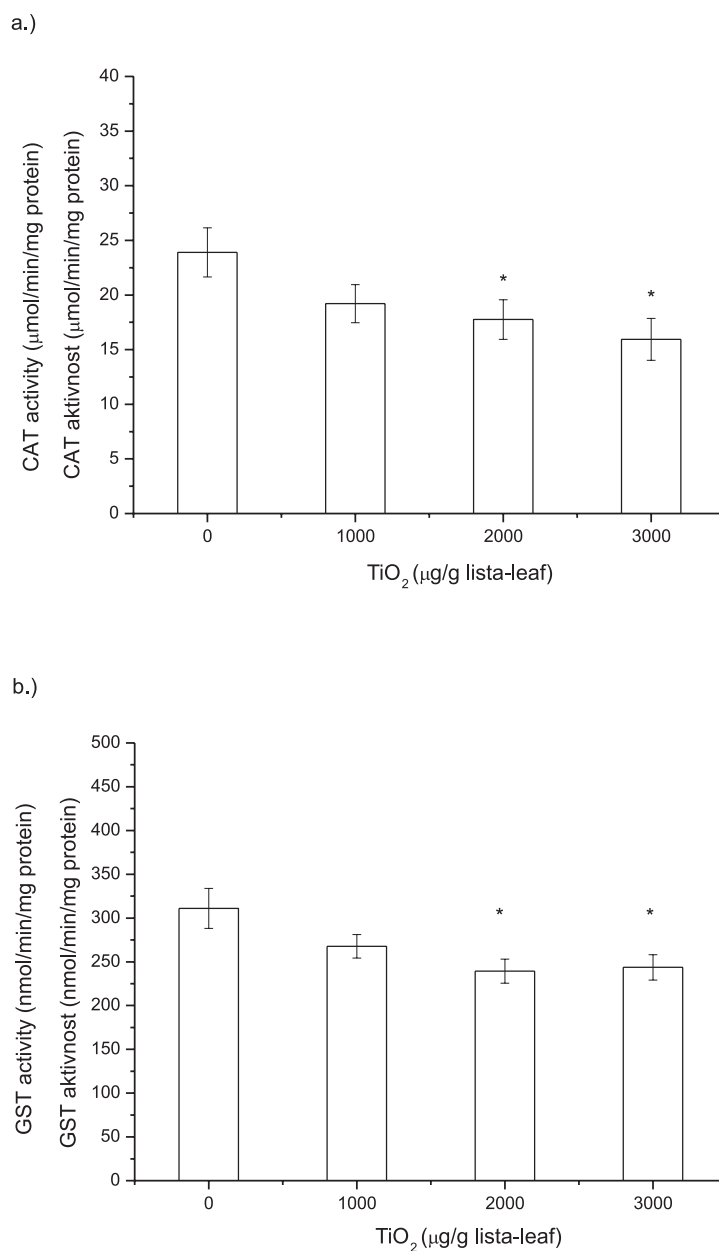


Slika 1. Shema 3-dnevnega prehranjevalnega poskusa z mokrico.
Figure 1. Experimental set-up of 3-days feeding of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*.



Slika 2: Vpliv TiO₂ na dnevno stopnjo hranjenja mokric (srednja vrednost ± standardna napaka). Simbol (*) pomeni statistično signifikantno razliko glede na kontrolo (Mann Whitney test, P<0.05).

Figure 2. The effect of TiO₂ on the daily feeding rate of isopods. Symbols on the box plot represent maximum and minimum value (-), mean value (!), median value (-) and significant changes compared to control (*) (Mann Whitney test, P<0.05).



Slika 3: Vpliv TiO_2 na aktivnosti encimov CAT (a) in GST (b) (srednja vrednost \pm standardna napaka). Simbol (*) pomeni statistično signifikantno razliko glede na kontrolo (Mann Whitney test, $P < 0.05$).

Figure 3. The effect of TiO_2 on catalase (a) and glutathione S-transferase (b). Symbols on the box plot represent maximum and minimum value (-), mean value (!), median value (-) and significant changes compared to control (*) (Mann Whitney test, $P < 0.05$).

pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč Bio-Tek® Instruments, USA; PowerWave™ XS. 50 µL 100 mM kalijevega fosfatnega pufru pH 6.5 smo zmešali z 50 µL 4 mM reduciranega glutationa, 50 µL 4mM CDNB in 50 µL vzorca. Reakcijo smo spremljali 3 min pri 340 nm in 25 °C.

Katalazno aktivnost smo merili na spektrofotometru (Shimadzu UV-2101PC spectrophotometer, Japan) (18). 100 µL vzorca smo dodali k 700 µL 11,5 mM raztopine H₂O₂ pripravljene v 50 mM kalijevem fosfatnem pufru pH 7.0. Reakcijo smo spremljali 2 minuti pri 240 nm in 25 °C.

Koncentracijo proteinov smo določali s komercialnim setom BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

Encimske aktivnosti smo izrazili kot število molov nastalega produkta/razgrajenega substrata na minuto in jih podali na mg proteina.

3 Rezultati in razprava

3.1 Prehranjevanje

Po statistični obdelavi podatkov smo ugotovili, da testirane koncentracije TiO₂ nimajo očitnega vpliva na prehranjevanje mokric. Statistično značilno razliko smo opazili le pri dnevni količini zaužite hrane, ki je bila pri najvišji koncentraciji TiO₂ rahlo povečana glede na kontrolne organizme. Nesignifikantno povečanje je opaziti tudi pri koncentraciji 1000 µg TiO₂/g lista (Slika 2). Navadno pri izpostavitvi kemikaliji pričakujemo zmanjšano prehranjevanje živali, vendar pa pojav povečanja prehranjevanja tudi ni izključen. Podoben rezultat smo v preteklosti dobili pri izpostavljanju nekaterim pesticidom (Drobne et al., neobjavljeni rezultati).

3.2 Aktivnosti encimov

Pri najvišjih koncentracijah TiO₂ sta bili aktivnosti obeh encimov zmanjšani (Slika 3). Aktivnosti izbranih encimov sta lahko pod vplivom kemikalije zmanjšani ali povečani, odvisno od koncentracije. Pri nizkih koncentracijah kemikalije sta navadno aktivnosti povečani, ker se inducirajo obrambni sistemi, pri visokih koncentracijah pa kemikalija sama po sebi inhibira aktivnost encima ali pa je le ta zmanjšan posredno zaradi splošno slabega stanja celice. V našem primeru sta bili aktivnosti obeh encimov signifikantno zmanjšani, na osnovi česar zaključujemo, da imajo testirane koncentracije vpliv na celične sisteme prebavne žleze mokrice, vendar

pa učinek ni bil opazen na višjih ravneh razen pri prehranjevanju.

Potrebne so nadaljne študije z višjimi koncentracijami, kjer bi študirali predvsem vpliv nanodelcev na višjih organizacijskih ravneh, ter poskusi z nižjimi koncentracijami, kjer nas zanima predvsem, če se omenjena encima inducirata zaradi nastanka ROS. Predlagamo tudi nadaljnje študije z različnimi časi izpostavljanja.

Trenutno o ekološki relevantnosti naših rezultatov težko razpravljamo, saj ni na voljo nobenih podatkov o koncentracijah nanodelcev TiO₂ v okolju. Dobljenih rezultatov tudi ne moremo primerjati z drugimi študijami, saj je ta študija ena imed redkih opravljenih na kopenskih nevretečarjih. Možna je primerjava z nekaterimi našimi neobjavljenimi rezultati, kjer smo enake učinke na aktivnost obeh encimov v enakem testnem sistemu dobili, ko smo živali izpostavili 100 µg Cd/g lista in 1000 µg Zn/g lista (naš laboratorij, neobjavljeno). Ti dve koncentraciji kovin sta glede na koncentracije v okolju zelo visoke, saj so mejne vrednosti za vnos v tla 0,5–1 µg Cd/g suhe mase in 160–200 µg Zn/g suhe mase (19). Le ena študija je na voljo o učinkih zaužitih nanodelcev TiO₂ na miši, kjer so po oralnem zaužitju 5 g teh nanodelcev/ kg telesne teže opazili histopatološke učinke na jetrih in ledvicah (20).

4 Zaključek

V prispevku smo predstavili testni sistem z mokrico *Porcellio scaber* za proučevanje vplivov nanomaterialov na organizme. Menimo, da je predstavljeni pristop testiranja hiter, ponovljiv in nudi veliko informacij o mehanizmih delovanja neke kemikalije/nanomateriala, saj nam omogoča proučevanje vplivov na več ravneh biološke organizacije. Zavedamo se, da so kakršne koli korelacije med vplivi nanomaterialov na mokrice in človekom nemogoče, vendar pa so v začetni fazi proučevanja neznanih kemikalij bazične študije zelo dobrodošle. Poleg tega ne smemo pozabiti dejstva, da bo velika uporaba nanomaterialov rezultirala v njihovem pojavljanju v naravnem okolju, kar bo imelo velik vpliv na organizme, ki žive v tem okolju in posledično tudi na nas. Opozoriti želimo, da se bomo v prihodnosti srečali s posledicami izrednega razvoja nanotehnologij, med katerimi bodo mnoge za nas zelo koristne, s pospešenimi nanotoksikološkimi študijami pa moramo poskrbeti, da bo tistih

negativnih čimmanj. To bo prav gotovo velik izziv javnemu zdravstvu v tretjem tisočletju.

Zahvala

Želimo se zahvaliti za financiranje s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost RS (P2-0150) ter Slovenski znanstveni fundaciji za štipendiranje Anite Jemec (štipendija s strani World Federation of Scientists).

Literatura

1. The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. Nanoscience and nanotechnologies, julij 2004. Pridobljeno 20.5.2007 s spletne strani: <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>.
2. Friedrichs S, Schulte J. Environmental, health and safety aspects of nanotechnology-implications for the R&D in (small) companies. *Sci Technol Adv Mat* 2007; 8: 12-18.
3. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311: 622-7.
4. Holsapple MP, Lehman-McKeeman LD. Forum Series: Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. *Toxicol Sci* 2005; 87: 315.
5. Drobne D. Terrestrial isopods- a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environ Toxicol and Chem* 1997; 16: 1159-64.
6. Adams SM. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 2002.
7. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd edition. Clarendon, Oxford, 1999.
8. Stone V, Shaw J, Brown DM, Macnee W, Faux SP, Donaldson K. The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicol in Vitro* 1998; 12: 649-59.
9. Oberdörster G, Stone V, Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology* 2007; 1: 2-25.
10. Gould P. Nanomaterials face control measures. *Nanotoday* 2006; 1: 34-9.
11. Oberdörster G, Ferin J, Finkelstein G, Wade P, Corson N. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? II. Lunge lavage studies. *J Aerosol Sci* 1990; 21: 384-7.
12. Afaq F, Abidi P, Matin R, Rahman Q. Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophage exposed to ultrafine titanium dioxide. *J Appl Toxicol* 1998; 18: 307-12.
13. Gurr JR, Wang ASS, Chen, CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 2005; 213(1/2): 66-73.
14. Borm PJA, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part Fibre Toxicol 2006; 3: 11.
15. Lovern SB, Klaper R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem* 2006; 25: 1132-7.
16. Hund-Rinke K, Simon M. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids. *Environ Sci & Pollut Res* 2006; online first 1-8.
17. Stanek K, Drobne D, Trebše P. Linkage of biomarkers along levels of biological complexity in juvenile and adult diazinon fed terrestrial isopod (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea). *Chemosphere* 2006; 64: 1745-52.
18. Jemec A, Drobne D., Tišler T, Trebše P, Roš M, Sepčič K. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comp Biochem Physiol* 2007; 144 C: 303-9.
19. Pravilnik o obremenjevanju tal z vnašanjem odpadkov, Uradni list RS 3/2003, str.25.
20. Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters* 2007; 168:176-85.