

생쥐 Preantral 난포의 체외배양: FSH의 종류와 농도 및 초자화 냉동보존의 영향¹

차병원 여성의학연구소², 포천중문 의과대학교³

이숙현² · 신창숙² · 정형민^{2,3} · 고정재^{2,3} · 차광렬^{2,3} · 이경아^{2,3}

In Vitro Culture of the Isolated Mouse Preantral Follicles: Effect of Different Types of FSH and Vitrification¹

Sook Hyun Lee², Chang Sook Shin², Hyung Min Chung^{2,3}, Jung Jae Ko^{2,3}
Kwang Yul Cha^{2,3}, Kyung-Ah Lee^{2,3}

*Infertility Medical Center², CHA General Hospital, College of Medicine,
Pochon CHA University³, Seoul, 135-081, Korea*

Objectives: 1) To compare the efficacy of urofollitropin (Follimon) to that of recombinant human FSH (rhFSH) on the growth and maturation of mouse early preantral follicles in vitro, and 2) effect of vitrification on the growth and maturation of preantral follicles and oocytes.

Methods: Isolated early preantral follicles (100~130 µm diameter) were cultured for 12 days in 20 µl α-MEM media drop under the mineral oil. Follimon or rhFSH was added to the culture medium at various concentrations (0, 10, 100, and 1000 mIU/ml).

Results: With Follimon, the dose of 10 mIU/ml showed the best follicle survival, growth, and MII rate of oocyte than the other concentrations. Whereas the optimal dose of rhFSH was 100 mIU/ml. Despite the different optimal doses, the efficacy of two different FSHs on the follicle growth and maturation was similar. Isolated mouse preantral follicles were cryopreserved by vitrification and cultured in vitro for 12 days with 100 mIU/ml rhFSH. Despite the decreased follicular survival rate after thawing, the follicular growth and maturation rate of its oocyte were comparable to those of the fresh follicle.

Conclusion: Results from the present study revealed that 1) the optimal doses of Follimon and rhFSH for in-vitro culture of mouse follicles are different, and 2) the frozen-thawed follicles develop normally after vitrification.

Key Words: Follimon/ Recombinant human FSH/ In-vitro follicle culture/ Mouse/ Vitrification

냉동보존된 난소조직이 이용되기 위해서는 조직 안에 존재하는 난포의 발달이 일어나야 하기 때문에 난포의 체외배양은 난소조직의 냉동보존법과 함께 매우 중요하게 연구되고 있다. 냉동보존된 사람의 난소조직에 존재하는 난포를 체외에서 성장시켜 성숙된 난자를 얻을 수 있다면 암환자 뿐 아니라 불임환자에게도 임신의 기회를 제공할 수 있는 길을 열어줌으로써, 난소조직의 냉동보존은 매우 커다

란 의의를 가진다고 할 수 있다. 그러나, 사람 난포의 체외배양은 매우 긴 시간과 여러 가지 복잡한 배양방법이 요구되어 아직까지 적절한 배양법이 개발되지 못한 상태이다. 따라서 동물의 난포를 체외 배양하여 얻은 배양조건을 사람 난포의 배양에 적용하고자 하는 연구들이 진행되어 왔다.

생쥐의 경우¹ 원시 난포를 배양하여 성숙한 난자를 얻은 후 산자를 얻었다는 보고 이후 난포의 체외

¹본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 (HMP-98-M-5-0054)의 지원으로 수행되었음.

배양에 관한 연구가 활발히 진행되었다. 특히 Cortvrintd 등은 생쥐 초기 preantral 난포를 분리하여 각각의 난포를 배양하여 수정이 가능한 성숙된 난자를 얻을 수 있었다.² 분리된 생쥐 난포의 배양에 필요한 산소농도는 5% 보다 20%에서 더 좋은 성적을 얻었다는 보고가 있고,³ 최적의 난포 배양기간으로 12일 배양시에 난자의 성숙이 가장 많이 일어났다는 보고도 있다.⁴ 또한 생쥐 난포를 각각 따로 배양하였기 때문에 난포의 배양시에 FSH가 미치는 정확한 역할을 확인할 수 있었고,⁵ 난포 배양시에 FSH 외에도 LH가 난포의 antral like cavity 형성을 촉진시켜 난자가 metaphase II 상태의 성숙한 난자로 발달하는데 중요한 역할을 한다는 것이 보고되었다.⁶

생쥐의 경우 냉동보존된 난포의 발달을 조사하기 위하여 체외에서 분리된 난포를 냉동용해한 후 배양하거나,⁷ 난소조직 자체를 냉동용해하여 난포를 분리하고 각각의 난포를 배양하여 성숙한 난자를 얻은 결과가 보고된 바 있다.⁸ 위의 두 가지 실험에서 사용된 냉동법은 slow freezing 방법이었고, 해동 후에 얻은 난포는 fresh한 경우에 비해 냉해를 받아서 생존율은 감소하였으나, 정상적 형태를 보이면서 살아있는 난포의 경우는 fresh한 난포의 경우와 발달에 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.⁷

본 연구는 분리된 생쥐 초기 preantral 난포의 배양시에 서로 다른 두가지의 FSH를 사용하여 이들이 각각 난포 발달에 미치는 영향과 최적으로 작용하는 농도를 비교해 보기 위해 수행되었다. 또한, 본 실험에서 정해진 가장 적합한 배양환경에서 초자화 냉동법으로 냉동용해한 난포를 배양하여 난자의 성숙 정도가 어떠한 차이를 나타내는지 비교해 보았다.

연구대상 및 방법

1. 생쥐 난포 준비

생후 14일 된 F1 생쥐 (C57BL×CBA)를 경추탈골시킨 후 난소를 얻어 Leibovitz' L-15 (GibcoBRL, Gaithersburg, USA) 배양액으로 세척한 후 해부현미경 하에서 27계이지 주사기 (BD, USA)를 이용하여 난포를 분리한 후 100 μm~130 μm 크기의 초기 preantral 난포를 실험에 사용하였다.

2. 분리된 생쥐 난포의 체외배양: FSH의 종류 및 농도의 영향

분리된 초기 preantral 난포를 20 μl의 배양액 drop에 각각 하나씩 넣고, 미리 평형화시킨 paraffin oil

(BDH, Poole, England)로 덮어 5% CO₂ 상태가 유지되는 37°C incubator에서 12일 동안 배양하였다. 배양액은 α-MEM glutamax media (GibcoBRL, Gaithersburg, USA)에 ITS complex (6.25 μg/ml insulin, 6.25 μg/ml transferrin, 6.25 ng/ml selenious acid), 50 μg/ml streptomycin sulfate, 그리고 75 μg/ml Penicillin-G를 첨가하여 0.22 μm filter로 여과한 후 5%의 fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, Gaithersburg, USA)을 첨가하여 사용하였다. 두 종류의 FSH 즉, urofollitropin인 Follimon® (LG Chem. Ltd, Korea)과 recombinant human FSH (Lot number: BLCA9803, Ares-Serono, Switzerland)를 이용하여 FSH가 난포배양에 미치는 영향을 비교 조사하였다. 각 FSH는 적정농도를 찾기 위해 0 mIU/ml, 10 mIU/ml, 100 mIU/ml, 1000 mIU/ml의 네 가지 농도로 희석하여 배양액에 첨가하였고, 배양액은 2일에 한번, 절반씩을 교체하였다. 이 때 난포의 생존 상태의 판단 기준으로는 해부현미경 하에서 granulosa cell에 둘러싸여서 정상적인 성장을 하는 것으로 관찰된 난포는 살아 있다고 간주하였고, 난자가 밖으로 터져 나오는 경우는 제외하였다. 살아있는 난포의 성장은 해부현미경 하에서 난포의 크기를 측정하여 조사하였다. 12일 동안 배양된 난포에서 얻은 cumulus-oocyte complex는 성숙을 위해 10 IU/ml hCG와 PMSG가 첨가된 배양액에서 18시간 동안 배양하였다. 그 후 얻어진 난자의 성숙 상태를 해부현미경 하에서 관찰하였다. 생존한 난자 중에 극체를 형성한 난자를 조사하여 MII rate를 조사하였다.

3. 분리된 생쥐 난포의 체외배양: 초자화냉동 및 해동의 영향

1) 초자화냉동

분리된 난포를 초자화냉동하기 위해 사용된 항동해제는 Lee⁹ 등이 사용한 바 있는 EG 5.5를 사용하였다. 항동해제는 Leibovitz's L-15 medium에 5.5 M Ethylene Glycol (Sigma, St.Louis, USA)과 1 M Sucrose (Sigma, St.Louis, USA), 10% FBS를 첨가한 것으로, 0.22 μm filter로 여과하여 준비하였다. 준비된 생쥐 난포를 상온으로 평형화되어 있는 EG 5.5에 10초 동안 노출시킨 후 전자현미경용 구리 grid 위에 8개씩 얹어 주위의 항동해제를 여과지로 제거한 후 곧바로 액체질소에 넣어 동결시켰다. 냉동된 난포를 해동하기 위해 액체질소에서 꺼낸 grid를 0.5 M sucrose 용액에 1분간 처리한 후 0.25 M, 0.125 M sucrose 용액으로 옮겨 각각 1분씩 처리해 주었고, Leibovitz's L-15 medium에 1분씩 두 번 세척하였다.

해동에 사용된 sucrose 용액은 10% FBS가 첨가되었고, 37°C를 유지시켜 주었다. 해동된 난포는 배양기에서 30분간 보관된 후 배양에 사용되었다.

2) 해동된 난포의 배양

해동된 난포의 배양은 fresh한 난포의 배양과 같은 조건으로 수행하여 난포의 발달과 난자의 성숙정도를 비교하였다. 그러나 FSH 자체만의 영향을 보기 위해 rhFSH를 이용하였고, 이 때 사용된 rhFSH 농도는 이전 실험에서 가장 최적의 농도로 결정된 100 mIU/ml이었다. 난포의 발달과 antrum like cavity 형성이 촉진되어 난자의 성숙이 잘 일어나도록 하기 위해 배양액에 rhFSH 이외에도 recombinant human LH (rhLH, Lot number: BLCA9803, Ares-Serono, Switzerland)를 첨가하였다. 초기 배양 4일까지는 rhLH 농도를 100 mIU/ml을 처리하여 난포가 잘 부착하여 잘 자랄 수 있는 환경을 만들어 주었고, 4일 이후에는 난포의 이른 황체화를 막기 위해 rhLH 농도를 10 mIU/ml로 처리해 배양하였다. 이 때 배양액은 2일에 한번씩 절반의 양을 교환하였고, 각각 난포의 생존, 크기 증가와 antrum like cavity의 형성을 해부현미경 하에서 측정하였다. 12일까지 배양한 후 난자의 in vitro ovulation을 유도하기 위하여 1.5 IU/ml 농도의 hCG와 5 ng/ml 농도의 recombinant EGF (GibcoBRL, Gaithersburg, USA)를 배양액에 첨가하고 18시간 후에 oocyte-cumulus complex를 얻을 수 있었다.¹⁰ 얻어진 난자의 성숙정도는 해부현미경 하에서 관찰하였다.

4. 통계처리

배양된 난포의 생존율과 크기 증가, 배양 후의 난자의 성숙정도 등 실험에 사용된 모든 통계는 ANOVA로 분석하였다. 유의차에 대한 수준은 p 값이 0.05보다 작은 경우에 유의성이 있다고 분석하였다.

결 과

1. FSH의 종류 및 농도의 영향

Follimon과 rhFSH를 모두 처리하지 않은 대조군의 경우 12일 배양 후에 난포의 생존율이 10% 정도로 매우 낮은 것을 관찰하였다 (Figure 1A). 반면 Follimon을 넣은 경우 난포의 생존율은 농도에 상관없이 모두 80% 이상으로 나타났다. rhFSH를 처리한 경우는 Follimon과는 다르게 10 mIU/ml에서 30%의 낮은 생존율을 나타냈다 (p<0.05). 그러나, 두 종류의

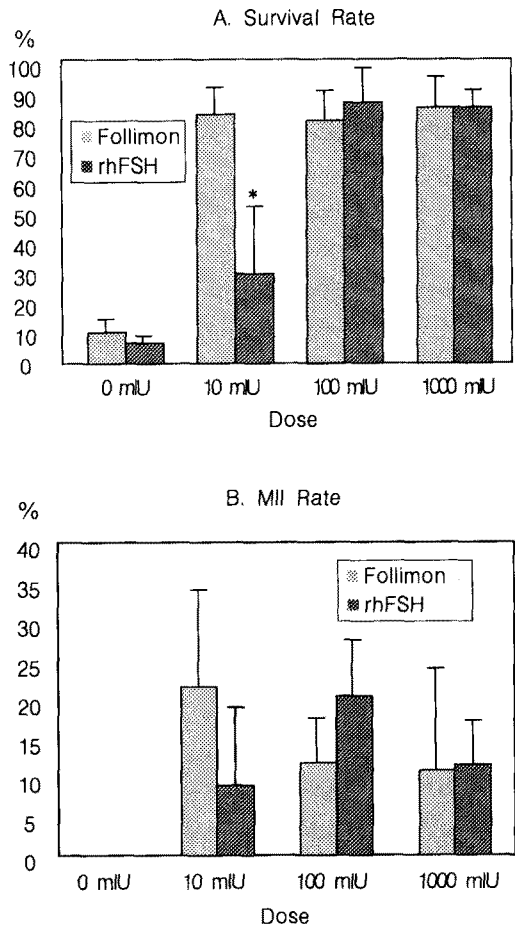


Figure 1. Comparison of the efficacy between Follimon (□) and rhFSH (■) supplemented to the culture media at various concentrations (0, 10, 100, 1000 mIU/ml). **A.** Survival rate of the mouse preantral follicles cultured for 12 days. **B.** Percentage of MII oocytes 18 hours after the addition of 10 IU/ml PMSG and hCG to the 12-day cultured follicles.

FSH를 100 mIU/ml과 1000 mIU/ml 농도로 함께 처리한 군에서는 80% 이상의 생존율을 보였다 (Figure 1A). 또한, 12일간의 난포배양 동안 난포의 크기 증가를 관찰한 결과, Follimon을 처리한 경우 10 mIU/ml에서 (Figure 2A), rhFSH를 처리한 경우 100 mIU/ml에서 가장 많이 증가하는 것을 관찰하였다 (Figure 2B). 12일 동안 난포를 배양한 후 난자의 성숙정도를 관찰한 결과, Follimon은 10 mIU/ml의 농도에서, rhFSH는 100 mIU/ml의 농도에서 가장 높은 난자 성숙율을 나타내었으나, FSH의 종류나 농도에 대해 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다

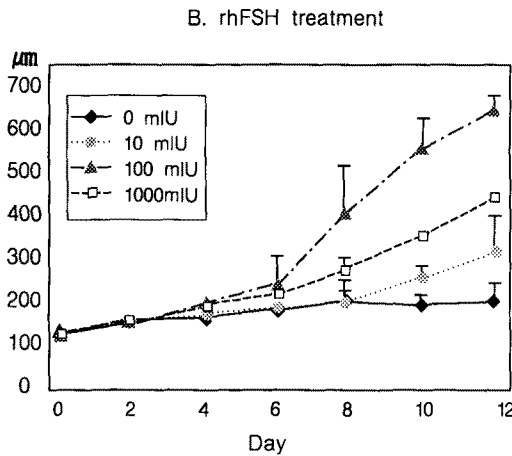
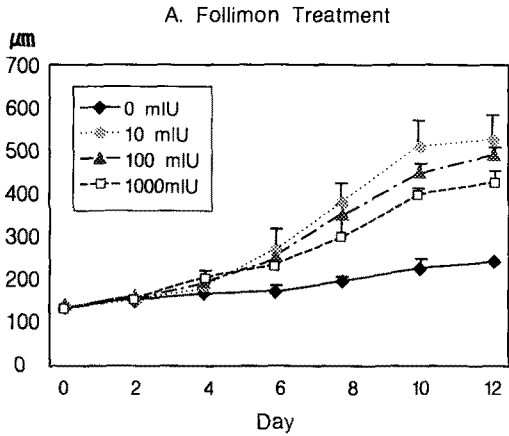


Figure 2. Follicular growth with various concentrations of FSH (0, 10, 100, 1000 mIU/ml) during 12-day culture. Follicular diameter was measured every other day. **A.** Follimon was added to the culture medium. **B.** rhFSH was added to the culture medium.

(Figure 1B). 이로서 Follimon의 경우는 10 mIU/ml의 농도가, rhFSH의 경우는 100 mIU/ml의 농도가 최적의 난포 성장을 나타내는 농도인 것을 알 수 있었다.

2. 초자화생동의 영향

Figure 3에는 냉동융해가 난포의 성장 및 난자의 성숙에 미치는 영향을 나타내었다. 냉동융해한 난포를 12일 동안 체외배양한 결과 난포의 생존율이 반 이하로 감소하는 것을 관찰하였다 (Figure 3A). 그러나, 일단 냉동융해로부터 살아 남은 난포에서 관찰되는 antrum like cavity 형성정도나 (Figure 3A), 난자의 성숙율은 fresh한 난포의 경우와 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Figure 3B). Fresh한 난포의

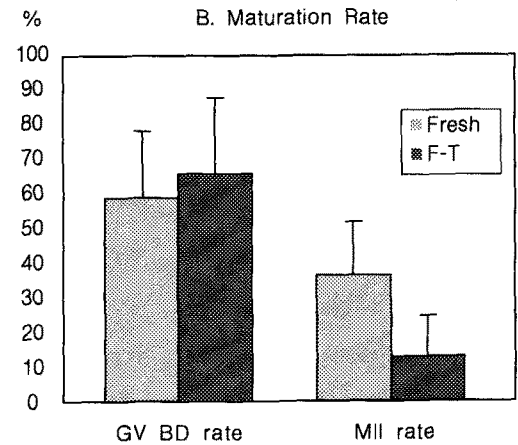
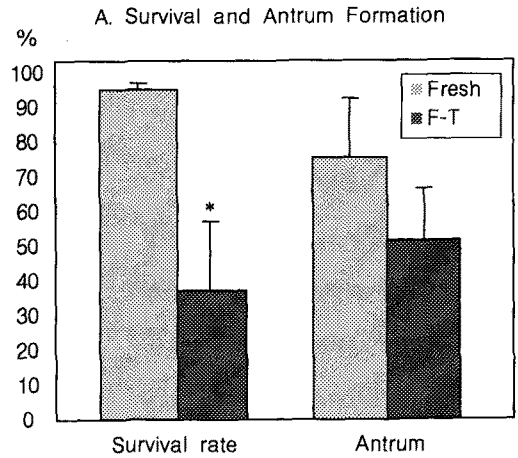


Figure 3. Comparison of characteristics between fresh and frozen-thawed mouse preantral follicles cultured for 12 days in 20 µl α -MEM media drop under the mineral oil. **A.** survival and antrum formation rate of follicles. **B.** Percentages of GVBD and MII oocytes obtained from the 12-day cultured follicles followed by 18 hours of culture with 1.5 IU/ml hCG and 5 ng/ml rEGF.

배양 결과와 냉동융해된 난포의 배양 결과를 비교해 볼 때 냉동융해된 난포는 크기가 더 작고, 크기의 증가폭도 더 느려서 체외발달이 지체되는 경향은 있었으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다 (Figure 4).

고 찰

본 연구는 분리된 생쥐 초기 preantral 난포의 체외배양시에 첨가되는 FSH, 그리고 냉동과 융해가 난포의 발달 및 난자 성숙에 미치는 영향을 조사해 보

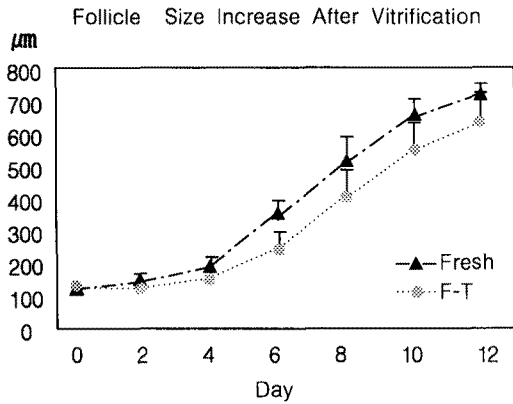


Figure 4. Comparison of growth rates between the fresh and frozen-thawed mouse follicles during 12 days of in vitro culture. Dose of 100 mIU/ml rhFSH was added to the medium during culture.

기 위해 수행되었다.

약 28년 전 Ryle은 생쥐 난포 성숙에 FSH나 LH가 미치는 영향에 대해 연구하였는데, infantile 생쥐의 난소 배양시, FSH는 두 층 이상의 granulosa cell을 가진 난포의 성장을 촉진시켰고, LH는 theca cell의 분열을 촉진시켰다고 보고하였다.¹¹ 그러나, Ryle의 연구에서의 문제점은 사용한 gonadotropin이 순수하게 정제된 것이 아니었고, 난포가 아니라 난소 전체를 배양할 때 나타나는 난포 발달의 영향을 본 것이었기 때문에, 난포에 미치는 gonadotropin의 역할을 더 정확하게 조사하기 위해서는 분리된 초기 preantral 난포의 배양이 필요하였다. 그 후 분리된 각각의 난포 배양시에 rhFSH를 처리한 결과 FSH가 난포의 생존과 성장에 꼭 필요한 요소라는 것을 확인한 결과가 보고되었는데,⁵ 이들이 처리한 FSH의 농도로는 난포의 체외성장을 최대로 촉진시켜 준다고 이미 보고된 100 mIU/ml가 배양에 사용되었다.¹² 본 연구의 결과에서도 100 mIU/ml의 rhFSH가 난포의 생존율과 난자의 성숙에 가장 최적의 농도임을 확인할 수 있었다. 그러나, Follimon의 경우에는 10 mIU/ml의 농도가 가장 최적임을 확인할 수 있었다. Follimon은 urine에서 분리한 FSH이므로 아주 극소량이긴 하지만 LH가 포함되어 있고, 임상적으로 사용에 용이하게 하기 위해 부형제로서 유당이 첨가되어 있다. Follimon이 10 mIU/ml에서 rhFSH 100 mIU/ml에서와 거의 비슷한 난포 발달을 나타내는 이유는 이 첨가물들이 난포 발달에 추가적인 영향을 나타내기 때문이라 생각할 수 있다. Recombinant

human FSH와 Follimon이 난포 발달에 최적으로 나타나는 농도는 다르게 나타났지만, 난포의 성장과 난자의 성숙에 미치는 영향은 거의 차이가 없었다. 그러므로, 본 실험 결과를 통해, 난포 발달에 관한 실험에는 구하기 어렵고 값비싼 rhFSH 대신 구입이 용이하고, 임상적으로 많이 사용되고 있는 Follimon을 10 mIU/ml의 농도로 이용할 수 있을 것이다.

생쥐의 난소를 slow-freezing으로 냉동하거나,¹³ 초자화냉동을 하여 동소이식한 후에 난포의 성장을 관찰하거나 산자를 얻음으로써 난소의 냉동 후에도 난포가 발달한다는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 보고들에 의해 생쥐 난소에 존재하는 난포의 생존과 발달이 냉동용해 후에도 가능하다는 것을 알 수 있었다. 또한, 생쥐 난포의 체외배양을 통해 냉동 후 난포의 생존과 발달의 관찰이 가능하게 되어 냉동과 용해가 각각의 난포 발달에 미치는 영향을 확인할 수 있게 되었다. 본 연구에서는 생쥐 난포를 분리한 후 초자화냉동 하였다가 해동 후에 체외배양을 한 경우, 난포의 생존율이 fresh군에 비해 유의적으로 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 이때, 사용한 FSH는 초자화냉동 후 해동된 난포를 배양할 때 다른 물질이 난포 발달에 미칠 수 있는 영향을 제거하기 위해 rhFSH를 사용하였고, 처리농도는 앞의 실험에서 최적의 조건으로 밝혀진 100 mIU/ml로 사용하였다. 냉동 후 해동한 난포의 배양과정에서 배양 1일 후 난자가 granulosa cell로부터 분리되고 난포가 터지는 현상에 의해 난포가 죽는 것을 관찰할 수 있었는데, 이러한 현상은 slow-freezing 방법으로 난포를 냉동하여 배양하였을 때도 관찰된다고 보고된 바 있다.⁷ 이러한 결과로 인해 냉동이 난자 자체에 미치는 영향 이외에 난자와 granulosa cell의 연결에 관여하는 물질이나 세포막의 연결부위에 영향을 주어서 난포가 터지는 현상이 일어난다고 추측할 수 있다. 냉동 후 배양된 난포의 생존율은 감소하였지만 생존된 난포는 크기 증가의 비율이나, 난자의 성숙율이 fresh군과 유의적으로 차이를 나타내지 않았다. 그러므로 초자화냉동은 slow-freezing과 마찬가지로 난포의 생존율은 감소시키지만 생존한 난포의 상태에는 큰 영향을 나타내지 않는다고 할 수 있겠다.

난소조직에는 수많은 원시 난포들이 존재하므로 냉동보존 후 난포의 생존율은 감소되지만 생존한 난포들이 정상적으로 발달된다면 충분한 수의 난자와 호르몬 환경을 얻을 수 있을 것이다. 또한 본 연구팀의 이전 연구 결과에서¹⁴ 조직내에 묻혀 있는 상

태로 초자화냉동 보존되었던 원시 난포의 생존율 (>80%)은 본 실험에서 preantral 난포를 분리한 후 초자화냉동 보존하였을 때 관찰된 생존율 (35%) 보다 훨씬 월등한 것이었다. 그러므로 불임환자나 후일에 임신을 원하는 암환자들을 위한 난소조직의 냉동보존은, 몇 개의 난자만을 보존하는 방법에 비해 훨씬 유리한 대체방안이라고 생각되고, 이런 관점에서 앞으로 사람의 난포 배양 특히 원시 난포로부터의 배양에 관한 연구가 더 많이 수행되어야 할 것이라 생각된다.

본 연구는 생쥐 난포 발달에 가장 적절하게 필요한 FSH의 농도와 배양조건에 대해 조사하였고, 이는 앞으로 생쥐 난포의 기본적인 발달 mechanism을 연구하는데 더 많은 도움을 줄 것이라 사료된다. 그리고 초자화냉동 후에도 생쥐 난포의 체외배양이 가능하다는 것을 확인함으로써, 앞으로 사람의 난소에 존재하는 난포의 초자화냉동 및 체외발달에 필요한 배양조건 확립에 대한 기초적인 자료가 제시되었다고 할 수 있다.

감사의 글

본 실험을 수행할 수 있도록 rhFSH, rhLH를 공급해 주신 Ares-Serono (Switzerland)와 Follimon을 공급해 주신 LG화학에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- Eppig JJ, O'Brien MJ. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 54: 197-207.
- Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. A morphological and functional study of the effect of slow freezing followed by complete in-vitro maturation of primary mouse ovarian follicles. *Human Reprod* 1996b; 11: 2648-55.
- Smitz J, Cortvrindt R, Van Steirteghem AC. Normal oxygen atmosphere is essential for the solitary long-term culture of early preantral mouse follicles. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 466-75.
- Cortvrindt R, Hu Y, Liu J, Smitz J. Timed analysis of the nuclear maturation of oocytes in early preantral mouse follicle culture supplemented with recombinant gonadotropin. *Fertil Steril* 1998b; 70: 1114-25.
- Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Human Reprod* 1997; 12: 759-68.
- Cortvrindt R, Hu Y, Smitz J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Human Reprod* 1998a; 13: 1292-302.
- Cortvrindt R, Smitz J, Van Steirteghem AC. In-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. *Human Reprod* 1996a; 11: 2656-66.
- Smitz J, Cortvrindt R. Follicle culture after ovarian cryostorage. *Maturitas* 1998; 30: 171-9.
- Lee KA, Lee SH, Yoon SJ, Ko JJ, Cha KY. Ovarian development of vitrified neonatal ovaries after orthotopic transplantation into adult recipient. *Korean J Fertil Steril* 1999; 26: 219-23.
- Smitz J, Cortvrindt R, Hu Y. Epidermal growth factor combined with recombinant human chorionic gonadotropin improves meiotic progression in mouse follicle-enclosed oocyte culture. *Human Reprod* 1998; 13: 664-9.
- Ryle M. The growth in vitro of mouse ovarian follicles of different sizes in response to purified gonadotropins. *J Reprod Fertil* 1972; 30: 395-405.
- Nayudu PL, Osborn SM. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 349-62.
- Gunaseena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Human Reprod* 1997; 12: 101-6.
- Lee KA, Lee SH, Ha SD, Yoon SJ, Ko JJ, Lee WS, Yoon TK, Cha KY. Cryopreservation of human adult ovarian cortical tissues by vitrification. *Korean J Fertil Steril* 1999; 26: 251-56.