

Mancozeb이 마우스 비장세포의 IFN- γ 생성능에 미치는 영향

표명윤*, 정애희¹

숙명여자대학교 약학대학, ¹서울특별시 보건환경연구원

Effects of Mancozeb on IFN- γ Production of Mice Splenocytes

Myoung-Yun Pyo* and Ae-Hee Cheong¹

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

¹Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public and Environment, Seoul 137-734, Korea

ABSTRACT

Mancozeb (MCZ), a polymeric complex of zinc and manganese salts of ethylene bithiocarbamate, is widely used in agriculture as fungicides, insecticides, and herbicides. MCZ can be occupationally and environmentally exposed to human and has been reported to have detrimental effects on the reproductive system, but the toxicity of MCZ on immune responses has not been systematically investigated. We investigated the effects of MCZ exposure on the activities of murine splenocytes through evaluation of splenocytes cellularity and INF- γ synthesis. Splenocytes were examined *ex vivo* from mice orally treated with various doses of MCZ for 1 day (acute exposure, 2,500, 5,000, 10,000 mg/kg) or for 5 consecutive days per week for 4 weeks (subacute exposure, 250, 1,000, 1,500 mg/kg/day) followed by culture for 2 days in the presence of Con A or PHA plus IL-2. Splenocytes from naive mice were cultured with various concentration of MCZ (50, 500, 1,000 ng/mL) in the presence of Con A or PHA plus IL-2 for 2 days *in vitro*. IFN- γ production was decreased with the *in vitro* exposure to all concentration of MCZ. The spleen cellularity and IFN- γ production by splenocytes from MCZ-*acutely* and *-subacutely* exposed mice were decreased in comparison with that of control group.

Key words : Mancozeb, IFN- γ , spleen cellularity

서 론

Mancozeb은 ethylene bisdithiocarbamate의 zinc와 manganese의 polymeric complex로 과일, 야채, 견과류, 농작물 등의 광범위한 살균제로 쓰이며, 사용법이 간편하고 단가가 저렴하여 우리나라에서도 사용량이 많은 농약이다(농약연보, 1999).

Mancozeb은 rat에서의 경구 LD₅₀가 8~15 g/kg/day (Kackar *et al.*, 1977a; Hurley *et al.*, 1998)로 독성이 약한 편이지만 male rat에 Mancozeb을 경구 투여할 경우, 갑상선은 체중비에 따라 thyroid peroxidase와 thyroxine (T4)은 용량과 투여기간에 따라 의존적으로 변화하고 (Kackar *et al.*, 1977a; Mehrota. *et al.*, 1990; Trivedi *et al.*, 1993) rat에 Mancozeb이 함유된 사료를 공급하면 체중감소 (Varnagy *et al.*, 2001)와 간과 갑상선무게가 증가하고, 고용량 (253 mg/kg, 379 mg/kg)에서는 신장, 부

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-710-9573, E-mail: mypyo@sookmyung.ac.kr

신, 정소 중량이 증가함을 보이며, 저용량(50 mg/kg)에서는 갑상선의 기능 손상이 되며 갑상선 호르몬 농도가 변화(Szepvolgyi *et al.*, 1989)하는 등 Mancozeb의 갑상선에 대한 기관독성이 있음을 보고하고 있다.

Male rat에 1,000 mg/kg/day를 35일간 경구투여했을 때 정소의 정자 수 감소와 이상정자 증가가 나타나고(Harris *et al.*, 2000), 동량을 180일간 경구투여했을 때는 정소중량 증가 및 정소상체 중량 감소가 있다고 보고되고 있으며(Mahadevaswami *et al.*, 2000), female rat에 Mancozeb 투여후 성주기 변화와 건강 난포의 감소, 폐쇄 난포의 증가(Baligar and Kaliwal, 2001), 마우스의 착상억제(Bindali and Kaliwal, 2002) 등과 만성노출 후 male rat의 정액 감소 및 고환 중량증가, 부고환의 중량감소 등 생식선에 나타나는 병리학적인 변화(Kackar *et al.*, 1997b) 등에 관한 보고가 있다. 또한 Mancozeb을 rat에 104주 동안 식이 투여하였을 때 유방종양, 귀암, 간암, 췌장종양, 갑상선종양, 두개골의 뼈육종, 혈액임파망상구의 신형성 등의 증가(Belpoggi *et al.*, 2002)와 rat에서 nitrosomethylurea (NMU)로 유발된 췌장암을 촉진한다는 보고(Larsson *et al.*, 1976; Monis and Valentich, 1993)도 있으며 Colosio 등(1996)은 내분비계장애물질로 분류되고 있는 Mancozeb을 장기간 직업적으로 노출된 사람에게서 면역계 변화가 약하게 나타난다고 보고하였다. 그러나 Mancozeb의 일반독성이나 유전독성 및 생식독성 등에 대한 연구결과에 비해 면역계에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 보고 되지 않다. 그러므로 Mancozeb이 실험동물모델인 마우스의 면역계에 미치는 영향을 체계적으로 연구하기 위하여 본 연구에서는 Mancozeb을 *in vitro*에서 직접 처리하거나 급성 또는 아급성 노출시킨 후 *ex vivo*에서 비장세포의 IFN- γ 생성능을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

실험물질로는 Mancozeb (86.5%, technical grade, Dau Agro Science, France)을 (주)경농에서 공급받아 사용하였고, 시약으로는 Gibco 제품인 RPMI

1640 medium power, fetal bovine serum (FBS), antibiotic-antimycotic agent, MEM- α nonessential amino acid, sodium bicarbonate, trypan blue, Hank's balanced salt solution (HBSS), Sigma 제품인 concanavalin A (ConA), phytohemagglutinin (PHA), Roche 제품인 interleukin-2 (IL-2), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), PharMingen 제품인 Mouse IFN- γ set, tetramethylbenzidine (TMB), hydrogen peroxidase 등을 사용하였으며, 그 외의 시약은 모두 세포배양용 또는 특급을 사용하였다. 기기로는 CO₂ incubator (NAPCO, Precision scientific Inc.), ELISA microplate reader (ELx800, BIO-TEK instruments Co.), Auto strip washer (ELx800, BIO-TEK instruments Co.) 등을 사용하였다.

2. 실험동물

3~4주령인 ICR계 암컷 마우스를 유한양행 중앙연구소로부터 분양받아 고품사료(삼양사)와 수돗물을 자유롭게 공급하면서 실험동물실에서 2~3주간 적응시킨 후, 건강상태가 양호한 6~8주령(25 \pm 2g)의 마우스를 선택하여 실험에 사용하였다. 실험동물실의 온도는 21~24°C, 습도는 40~60%로 유지하였고 조명은 12시간 간격으로 조정하였다.

3. 실험물질의 조제 및 투여

in vitro 실험을 하기 위해서는 DMSO 1% 함유 배지에 Mancozeb를 용해하여 50, 500, 1,000 ng/mL 농도로 조정하여 실험하였다.

ex vivo 실험을 하기 위해서는 Mancozeb을 투여 직전 3차 증류수에 현탁하여 마우스 체중 10 g당 Mancozeb 현탁액 0.1 mL를 투여할 수 있는 농도로 조제한 다음, LD₅₀ (25,550 mg/kg)와 EPA의 면역독성시험 지침서(U.S. EPA, 1996)를 기준으로 하여 결정한 용량을 급성(2,500, 5,000, 10,000 mg/kg, 1회) 또는 아급성(250, 1,000, 1,500 mg/kg/day 용량으로 주 5회 30일간) 경구투여하였고, 대조군에는 동량의 3차 증류수를 같은 방법으로 투여하였다.

4. 비장세포수 측정

Mancozeb 투여 후 실험일, 즉 급성노출의 경우에

는 2일째에, 아급성 노출의 경우에는 32일째에 마우스의 비장을 적출하여 빙냉의 HBSS에 넣고 frosted microscope slides (Fisher Scientific)를 이용하여 비장세포액을 만들어 원심분리(1,000 rpm, 10 min, 4°C)하고 세포침전물에 RBC lysis buffer를 가하여 적혈구를 용혈시킨 후 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 침전된 비장세포에 일정량의 HBSS 용액을 가한 후 Turk's solution (Rakich *et al.*, 1998)으로 세포수를 측정하여 비장당 비장세포수를 계산하였다.

5. 비장세포액 조제 및 배양

실험일에 정상 또는 Mancozeb을 투여한 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 빙냉의 RPMI-1640 배지액에 넣고 teflon pestle을 이용하여 200 mesh stainless sieve를 통과시키고 이 세포액에 RBC lysis buffer (0.15 M-NH₄Cl, 1M-KHCO₃, 0.1 mM-Na₂EDTA)를 가하여 원심분리(1000 rpm, 10 min, 4°C)하여 적혈구를 용혈시킨 후 상층액을 제거하였다. 침전된 비장세포에 10% FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지액을 가하여 trypan blue exclusion method (Mishell and Shiigi, 1980)로 4×10^6 cells/mL의 비장세포액이 되도록 조정하였다. 24 well flat bottomed plate의 각 well에 비장세포액 2×10^6 cells을 가하여 30분간 안정시킨(37°C, 5% CO₂) 후 Con A (2 μ g/mL) 또는 PHA (5 μ g/mL)와 IL-2 (0.1 μ g/mL)를 가한 다음 2일 동안 배양하여 얻은 배양액을 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

6. IFN- γ 측정

PharMingen에서 제공한 sandwich ELISA법에 준하여 anti-mouse IFN- γ monoclonal antibody를 96 well flat bottomed plate (Dy nex Immulon 4HBX)에 도포한 후 acetate plate sealer로 밀봉하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 auto strip washer를 이용하여 washing buffer로 3회 세척하고 blank well을 제외한 well에 각각 200 μ L의 10% FBS-PBS를 가하고 2시간동안 실온에서 방치하였다. 비장세포를 배양하여 얻은 상층액을 96 well flat bottomed plate 각 well에 100 μ L씩 duplicate로 가하고, 검량선을 작성하기 위하여 recombinant mouse IFN- γ 를 4,000, 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 pg/mL 농도

로 희석하여 100 μ L씩 duplicate로 가하고, plate를 acetate plate sealer로 봉하여 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 96 well flat bottomed plate를 5회 반복 세척한 후 biotinylated anti-mouse IFN- γ polyclonal antibody 용액을 well당 100 μ L씩 가하고 2시간 후에 다시 5회 세척하고 100 μ L의 avidin-horseradish peroxidase conjugate 용액을 각 well에 가하였다. 실온에서 30분간 방치한 뒤 plate를 7회 세척하고, 각 well에 TMB와 hydrogen peroxidase를 같은 부피로 혼합한 TMB substrate 용액을 100 μ L씩 가하고 15분 후 50 μ L의 2N-H₂SO₄를 가하여 반응을 정지시킨 다음 30분이내에 450 nm에서 흡광도를 측정하여 IFN- γ 를 정량하였다.

7. 통계 처리

각 실험군의 측정값의 평균과 표준편차를 구하고, 대조군의 실험치와 비교하여 Student's t-test로 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 비장세포수에 미치는 영향

Mancozeb을 경구적으로 1회 급성 노출 또는 주 5회 30일간 아급성 노출시킨 후 실험일(급성: 2일째, 아급성: 32일째)에 비장을 적출하여 비장세포수

Table 1. Splenic cellularity in the mice administered Mancozeb

Experimental group (mg/kg/day)	Splenocytes (1×10^6 /spleen)	
Exp. I	Control	18.9 \pm 3.8
	2,500	18.5 \pm 3.0
	5,000	21.6 \pm 1.6
	10,000	12.7 \pm 4.8*
Exp. II	Control	23.4 \pm 7.2
	250	21.3 \pm 2.9
	1,000	16.9 \pm 2.5
	1,500	15.5 \pm 3.3*

Mancozeb was acutely (Exp. I: 2,500, 5,000, 10,000 mg/kg, one time) or subacutely (Exp. II: 250, 1,000, 1,500 mg/kg/day, 30 days) administered to ICR mice. Mice were sacrificed on day 2 (Exp. I) or day 32 (Exp. II). The results are expressed as the means \pm S.D. of 3 separate experiments for 3 mice per group. Significant difference from control group (* $p < 0.05$).

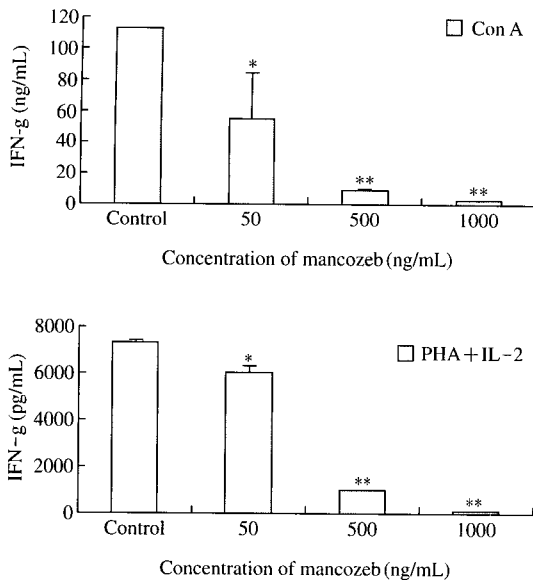


Fig. 1. Effect of Mancozeb on IFN- γ production from splenocytes stimulated with T cell mitogens *in vitro*. Mouse splenocytes were cultured with Mancozeb (50, 500, 1,000 ng/mL) in the presence of Con A (2 μ g/mL) or PHA (5 ng/mL) plus IL-2 (0.1 μ g/mL) for 2 days. Cytokine levels in culture supernatant were determined by ELISA. The results are expressed as the means \pm S.D. of 3 separate experiments (duplicated for experiment). Significant difference from control group (* p < 0.05, ** p < 0.01).

를 측정된 결과는 Table 1과 같다. 급성 노출의 경우 (Exp. I) 저용량 투여군은 대조군에 비하여 비장당 비장세포수가 크게 변화하지 않았으나 고용량인 10,000 mg/kg 투여군은 매우 유의성 (p < 0.05) 있게 약 32.6% 정도 감소되었다. 또한 250, 1,000, 1,500 mg/kg/day 용량으로 아급성 노출시 (Exp. II) 대조군에 비해 각각 9.0%, 27.8%, 33.8% (p < 0.05) 정도 감소하여 고용도의 Mancozeb에 반복적으로 노출될 경우에도 마우스의 비장세포수가 영향을 받는 것으로 보인다.

2. 비장세포의 IFN- γ 생성능에 미치는 영향

보조 T 세포(helper T 세포, Th cell)는 다른 임파구의 활성화를 촉진하며 각종 세포활성물질을 생성하는데, 생성하는 세포활성물질의 종류의 차이에 따라 type 1 T 세포(Th1 cell)와 type 2 T 세포(Th2

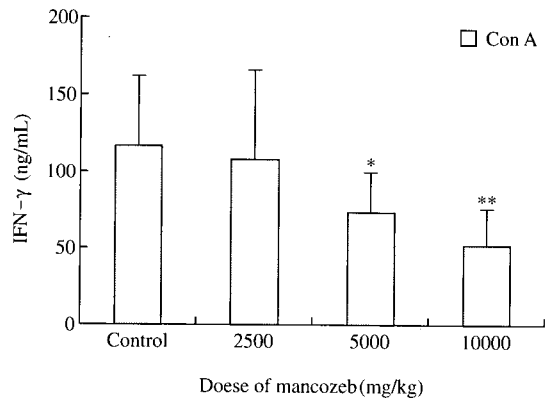


Fig. 2. Comparison of IFN- γ level produced from splenocytes collected after single exposure of Mancozeb. Mancozeb was orally administered to ICR mice (2,500, 5,000, 10,000 mg/kg) for one time. Mice were sacrificed on day 2 following administration of Mancozeb. Splenocytes were cultured with Con A (2 μ g/mL) for 2 days. Cytokine levels in culture supernatant were determined by ELISA. The results are expressed as the means \pm S.D. of 3 separate experiments for 3 mice per group. Significant difference from control group (* p < 0.05, ** p < 0.01).

cell)의 아집단으로 분류되며 (Abul and Andrew, 2003), IFN- γ 는 Th1 세포가 생성하는 대표적인 특징 cytokine으로 알려져 있다 (Kurt-Jones *et al.*, 1987; Swain *et al.*, 1991). Mancozeb을 비장세포에 직접 처리하거나 (*in vitro*) 경구적으로 급성 또는 아급성 노출시킨 후 (*ex vivo*) 비장세포의 IFN- γ 생성능을 측정된 결과는 다음과 같다.

in vitro 실험- Mancozeb이 비장세포의 IFN- γ 생성능에 미치는 영향을 측정하기 위하여 50, 500, 1,000 ng/mL이 되도록 조제한 Mancozeb을 비장세포액에 첨가하여 Con A 또는 PHA와 IL-2를 동시에 가하고 2일간 배양한 후 배양액 중의 IFN- γ 를 sandwich ELISA법으로 정량한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Mancozeb과 Con A를 함께 처리한 경우 대조군에 비해 50, 500, 1,000 ng/mL에서 각각 73.8%, 91.6%, 97.5% 정도 농도의존적으로 유의성 있게 (p < 0.01) 뚜렷이 감소하였으며 또한 다른 T cell mitogen인 PHA와 autocrine 성장인자인 IL-2를 동시에 처리한 경우에도 50, 500, 1,000 ng/mL 농도에서 대조군에 비해 각각 17.8% (p < 0.05),

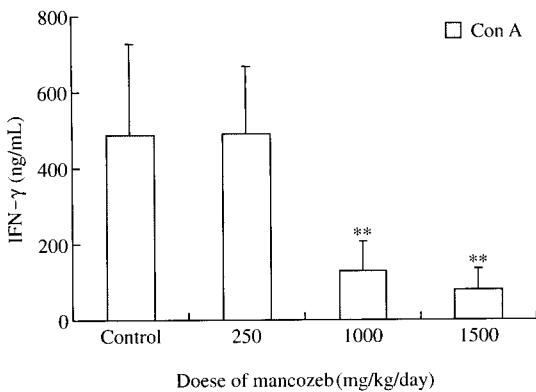


Fig. 3. Comparison of IFN- γ level produced from splenocytes collected after subacute exposure of Mancozeb. Mancozeb was orally administered to ICR mice (250, 1,000, 1,500 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. Splenocytes were cultured with Con A (2 μ g/mL) for 2 days. Cytokine levels in culture supernatant were determined by ELISA. The results are expressed as the means \pm S.D. of 3 separate experiments for 3 mice per group. Significant difference from control group (** p < 0.01).

86.3% (p < 0.01), 98.6% (p < 0.01) 정도 유의성있게 감소되었다. 비장세포를 mitogen인 Con A 또는 PHA와 IL-2와 배양하여 생성되는 IFN- γ 의 생성량이 Mancozeb의 처리로 인하여 감소되는 것으로 보아 Th1을 억제하는 것으로 보인다.

ex vivo 실험 - Mancozeb을 급성노출 용량으로 마우스에 1회 경구투여한 후 2일째에 마우스를 치사 후 조제한 비장세포액에 Con A를 가하여 2일간 배양한 후 배양액중의 IFN- γ 를 sandwich ELISA법으로 측정하였고, 그 결과는 Fig. 2와 같다.

T cell mitogen인 Con A를 처리한 배양액에서는 2,500 mg/kg 용량에서는 유의성 있는 차이를 볼 수 없었으나 5,000, 10,000 mg/kg에서는 각각 36.8%, 55.1% 정도 유의성 있게 (p < 0.05) 감소하여 생체내에 Mancozeb을 급성노출시에도 비장세포의 IFN- γ 의 생성능이 억제되는 것으로 나타났다.

Mancozeb을 아급성노출 용량으로 마우스에 주 5회 30일간 경구투여한 후 32일째에 마우스를 치사 후 조제한 비장세포액에 Con A를 가하고 2일간 배양하여 얻은 배양액 중의 IFN- γ 를 sandwich ELISA법으로 정량하여 나타낸 결과는 Fig. 3과 같

다. 비장세포를 Con A로 활성화시킨 경우 저용량인 250 mg/kg/day 실험군에서는 대조군에 비하여 배양액 중의 IFN- γ 생성량이 거의 변화가 없었으나, 1,000, 1,500 mg/kg/day 실험군에서는 각각 26.1%, 16.1% 정도 유의성있게 (p < 0.01) 감소경향을 보여 Mancozeb에 반복적으로 노출시에도 IFN- γ 의 생성이 현저히 감소하는 것을 알 수 있었다.

결론

내분비계 장애물질로 알려진 Mancozeb을 *in vitro*에서 비장세포에 농도별 (50, 500, 1,000 ng/mL)로 직접 처리하거나 마우스에 급성 (2,500, 5,000, 10,000 mg/kg, 1회) 또는 아급성 (250, 1,000, 1,500 mg/kg/day, 주 5회 30일간)으로 노출시킨 후 비장세포의 IFN- γ 의 생성능을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 비장세포를 mitogen인 Con A 또는 PHA와 IL-2와 배양하여 생성되는 IFN- γ 의 생성량이 *in vitro*에서 Mancozeb의 처리로 인하여 농도의존적으로 감소되었다. 또한 생체내에 Mancozeb을 급성노출 또는 반복적으로 노출시켜 *ex vivo* 실험을 한 결과 비장 당 비장세포수가 감소되었을 뿐만 아니라 비장세포의 IFN- γ 의 생성능이 억제되었다.

이상의 결과는 Mancozeb에 *in vitro*에서 뿐만 아니라 급성 및 아급성으로 노출된 비장세포의 IFN- γ 생성이 현저히 저하되는 것으로 나타나 Mancozeb은 보조 T 세포의 아집단인 type 1 T 세포 (Th1 cell)의 기능을 억제하는 것으로 보인다.

감사의 말씀

본 연구는 2004년도 숙명여자대학교 교내연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 농약연보 : 농약공업협회. 1999; 62-63
Abul K and Andrew H. Cellular and molecular immunology, Saunders, fifth edition 2003.

- Baligar PN and Kaliwal BB. Induction of gonadal toxicity to female rats after chronic exposure to mancozeb, *Ind Health* 2001; 39(3): 235-243.
- Belpoggi F, Soffritti M, Guarino M, Lamvertini L, Cevolani D and Maltoni C. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Ann NY Acad Sci* 2002; 982: 123-136.
- Bindali BB and Kaliwal BB. Anti-implantation effect of a carbamate fungicide mancozeb in albino mice, *Ind Health* 2002; 40(2): 191-197.
- Colosio C, Barcellini W, Maroni M, Alcini D, Bersani M, Cavallo D, Galli A, Meroni P, Pastorelli R, Rozzardi GP, Soleo L and Foa V. Immunomodulatory effects of occupational exposure to Mancozeb, *Arch Environ Health* 1996; 51(6): 445-451.
- Harris ML, Chora L, Bishop CA and Bogart JP. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two Amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*, *Bull Environ Contam Toxicol* 2000; 64: 263-270.
- Hurley PM, Hill RN and Whiting RJ. Mode of Carcinogenic Action of Pesticides Inducing Thyroid Follicular Cell Tumors in Rodents, *Environmental Health Perspectives* 1998; 106(8): 437-445.
- Kackar R, Srivastava MK and Raizada RB. Studies on Rat Thyroid after Oral Administration of Mancozeb: Morphological and Biochemical Evaluations, *Journal of Applied Toxicology* 1977a; 17(6): 369-375.
- Kackar R, Srivastava MK and Raizada RB. Induction of gonadal toxicity to male rats after chronic exposure to mancozeb, *Ind Health* 1977b; 35(1): 104-111.
- Kackar R, Srivastava MK and Raizada RB. Assessment of toxicological effects of mancozeb in male rats after chronic exposure, *Indian J Exp Biol* 1999; 37(6): 553-559.
- Larsson KS, Arnander C, Cekanova E and Kjellberg M. Studies of teratogenic effects of the dithiocarbamates Maneb, Mancozeb, and Propineb, *Teratology* 1976; 14: 171-184.
- Mahadevaswami MP, Jadaramkunti UC, Hiremath MB and Kaliwal BB. Effect of mancozeb on ovarian compensatory hypertrophy and biochemical constituents in hemicastrated albino rat, *Reproductive Toxicology* 2000; 14: 127-134.
- Mehrotra NK, Kumar S and Yogeshwer S. Enhancement of tumor-initiating activity of DMBA by the carbamate fungicide Mancozeb, *Bull Environ Contam Toxicol* 1990; 44: 39-45.
- Mishell BB and Shiigi SM. Selected methods in cellular immunology, W.H. Freeman and Company 1980; 14.
- Monis B and Valentich MA. Promoting effects of mancozeb on pancreas of nitrosomethylurea-treated rats, *Carcinogenesis* 1993; 14(5): 929-933.
- Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA and Weller RN. Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity, *J Endodon* 1998; 24: 528-533.
- Swain S, Brandley L, Croft M, Tonkonogy S, Atkins G, Weinberg A, Duncan D, Hedrick S, Dutton R and Huston G. Helper T cell subsets: phenotype, function and role of lymphokines in regulating their development, *Immunol Rev* 1991; 123: 115-144.
- Szepvolgyi J, Nagy K, Sajgone Vukan K, Regoly-Merei A, Soos K, Toth K, Pinter A and Antal M. Subacute toxicological examination of Dithane M-45, *Fd Chem Toxic* 1989; 2(8): 531-538.
- Trivedi N, Kackar R, Srivastava MK., Mithal A and Raizada RB. Effect of oral administration of fungicide-mancozeb on thyroid gland of rat, *Ind J Exp Biol* 1993; 31: 564-566.
- U.S. EPA. Health Effects Test Guidelines-Pesticides and Toxic Substances. Immunotoxicity 1996.
- Varnagy L, Budai P, Molnar E, Takacs I and Fejes S. One-generation reproduction toxicity study of mancozeb and lead acetate, *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk Toegep Biol Wet* 2001; 66(2b): 873-878.