

2 – 硝基 – 4’ – 羟基二苯胺(HC Orange No. 1)在 鲫鱼肝脏中的富集及其对肝脏抗氧化指标的 影响

孙媛媛^{1,2}, 于红霞¹, 沈 骅¹, 张景飞³, 刘红玲¹, 王晓蓉¹

(1. 南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 江苏 南京 210093; 2. 南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏 南京 210097; 3. 南京大学地球科学系, 江苏 南京 210093)

摘 要:采用室内模拟方法研究了 2 – 硝基 – 4’ – 羟基二苯胺(HC Orange No. 1)在鲫鱼(*Carassius auratus*)肝脏中的富集规律及不同暴露时间对鲫鱼肝脏抗氧化指标的影响。结果表明, 10 d 左右鲫鱼肝脏对 HC Orange No. 1 的富集达到最大值, 肝脏过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)及还原型谷胱甘肽(GSH)对 HC Orange No. 1 都非常敏感, 其中 GST 活性和 GSH 含量总体上被诱导增加; SOD 和 CAT 活性基本上都是先升高后受到抑制。上述抗氧化指标可考虑作为水生生态系统中 HC Orange No. 1 污染的生物监测指标。

关键词: 2 – 硝基 – 4’ – 羟基二苯胺(HC Orange No. 1); 暴露; 鲫鱼; 抗氧化防御系统; 生物富集

中图分类号: X503. 225 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 – 2043(2005)01 – 0026 – 05

Antioxidant Responses and Bioaccumulation in Liver of *Carassius aurats* Under 2 – Nitro – 4’ – Hydroxydiphenylamine (HC Orange No. 1) Exposure

SUN Yuan-yuan^{1,2}, YU Hong-xia¹, SHEN Hua¹, ZHANG Jing-fei³, LIU Hong-ling¹, WANG Xiao-rong¹

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. School of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 3. Department of Earth Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: A Laboratory experiment was carried out to determine accumulation and biochemical responses of 2 – nitro – 4’ – hydroxydiphenylamine (HC Orange No. 1) in liver of freshwater goldfish (*Carassius auratus*). The goldfish were exposed to 1. 0 mg · L⁻¹ HC Orange No. 1 for 2, 4, 7, 10 and 16 days, respectively, while control groups were accompanied with the each exposure groups, simultaneously. The chemical analyses showed that the accumulation of the chemical in liver tissue increased rapidly and shortly after the start of the exposure, and a maximum level was reached at the 10th day exposure, then it declined quickly until 16th day. Hepatic antioxidant defense parameters of fish, including contents of reduced glutathione (GSH) and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S – transferase (GST) were very sensitive to HC Orange No. 1 exposure. The contents of GSH and the activities of GST were induced during the whole exposure. The activities of SOD and CAT were induced firstly and then inhibited. The findings indicate that the tissue glutathione as well as other antioxidant enzymes function in protection against HC Orange No. 1 toxicity and that these antioxidants provide a first line of defense against HC Orange No. 1. These hepatic antioxidant parameters may act as biological monitoring indicators for HC Orange No. 1 pollution in aquatic ecosystems, and further studies will be necessary.

Keywords: 2 – Nitro – 4’ – hydroxydiphenylamine (HC Orange No. 1); exposure; *Carassius auratus*; antioxidant defenses; bioaccumulation

随着工业的发展和科技的进步,人类制造的化学制剂,无论是总量还是种类,都在持续不断地增长,并大量进入环境。目前环境中大约有 10×10^4 种人工合成的化学制剂,而且正以每年近 1 500 种的速度递增,其中 10% 的化合物的制造量足以威胁到环境的安全^[1]。染发剂是一种特殊用途的化妆品,它们成分复杂,有的染发剂含有 20 多种化学物质,这些化学物质能通过多种途径排放到自然界中,通过迁移转化其污染范围可进一步扩大。实验证明染发剂能破坏表皮屏障而进入生物体内,导致体内蓄积效应,并进一步对生物体造成损伤^[2]。2-硝基-4'-羟基二苯胺(HC Orange No. 1)被广泛地用作多种染料和半永久性染发剂,根据 1997 美国食品和药物管理局(FDA)的数据,该产品已广泛应用于 95 种染料和染发剂,目前对它的研究报道仅限于制造商报道的对哺乳动物的急性毒性数据和对皮肤的过敏性实验^[3]。2-硝基-4'-羟基二苯胺(HC Orange No. 1)在生产过程中可能会出现泄漏或废水排放,以及日常使用过程中产生的生活污水,常常会进入地表水。当它存在于水体中被水生生物富集后是否产生毒性效应,对水生生态系统是否产生影响,至今尚未见报道。因此此方面毒性效应亟待研究。

抗氧化系统的特征之一在于生物体内活性氧自由基增加时,抗氧化酶和部分抗氧化剂的合成可能相应增加,据此可作为机体遭受氧化胁迫的指示^[4]。尝试以这些抗氧化防御系统成分的变化作为有机污染胁迫的生物标记物的研究正在成为生态毒理学领域中新的热点^[5,6]。本文以幼龄鲫鱼为材料,研究了 16 d 期间 HC Orange No. 1 的动态暴露对鲫鱼肝脏抗氧化系统的影响并探讨其致毒机理,从而为科学评价该化合物对水生生物的影响提供更多的生物监测指标和理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:UV1600 型分光光度计;岛津 RF-5000 型荧光分光光度计;J2-HS 高速冷冻离心机(Beckman);HP1100 高效液相色谱仪。

试剂均采用分析纯以上试剂,HC Orange No. 1 购自南京科邦医药化工有限公司。

1.2 试验材料及染毒条件

试验对象为幼龄日本锦鲤,平均体长为 9.78 cm,平均体重为 30.8 g,养鱼用水为经过空气泵曝气 3 d

的自来水,试验前将鱼驯养 10 d。

根据预试验结果选取 $1/696 \text{ hLC}_{50}(1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 为暴露浓度。稳定性实验表明,化合物稳定性较好,挥发不超过 20%。选取健康的无体表损伤的幼龄鲫鱼作为试验用鱼,分为对照组和试验组。采用 40 L 的玻璃缸,盛水 35 L。随机将 6 条鱼投入鱼缸,微量曝气,容器口用铝箔盖住,每天更换一半溶液。对照组暴露于除氯自来水,试验组暴露于 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HC Orange No. 1 水中,暴露时间分别为 2、4、7、10、16 d。每组设 6 个平行样,重复进行。pH 值为 7.3 ± 0.3 ,水温 $(22.2 \pm 1)^\circ\text{C}$, $\text{DO} > 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,硬度约 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。驯养及试验期间鲫鱼生长正常。

1.3 取样和样品预处理

分别于暴露后第 2、4、7、10、16 d 取对照组和试验组样品,将鲫鱼活体解剖,取出肝脏,用冰生理盐水清洗其中血液,滤纸吸干,迅速称取适量置于冰浴中,加入冰冷的 Tris-蔗糖缓冲液(pH7.5),体积比为 10:1,用玻璃匀浆器匀浆,将匀浆液于 4°C , $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 15 min,取上清液置于 -50°C 冰箱内保存。另称取适量肝组织,加入预冷的 EDTA 溶液和稀 HClO_4 溶液,按上述方法匀浆离心,所得上清液用于 GSH 测量, -50°C 的冰箱内保存待用。

1.4 肝脏富集量分析

肝脏样品加无水硫酸钠磨干,用丙酮:乙酸乙酯(V:V)=2:1 溶液浸置过夜,超声萃取 60 min,取出上清液,重复超声萃取 2 次,上清液合并,旋转浓缩,过柱,柱中上层装无水硫酸钠,下层装弗罗里土。过柱后浓缩至 1 mL,甲醇定容。HPLC 分析,分析条件: C_{18} 柱,流动相:甲醇:水=70:30,检测器为 DAD235nm。

1.5 GSH 含量及酶活性的测定

GSH 含量测定^[8]: $100 \mu\text{L}$ 酶液,加入 2.8 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液(pH8.0)及 $100 \mu\text{L}$ $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的荧光试剂邻苯二甲醛(OPT),混匀,室温放置 10 min 后以 343 nm 为激发光(Ex),在 425 nm 处测荧光强度。单位定义为每克肝脏含 GSH 的毫克数。

CAT 活性测定^[9]:室温下,分别将 $50 \mu\text{L}$ 酶液加入含 3.0 mL 磷酸盐缓冲液的参比池和含 3.0 mL H_2O_2 -磷酸盐缓冲液的样品池中,用紫外分光光度计连续记录 A_{250} 值在 100 s 内的变化。定义 25°C 下,100 s 内使过氧化氢分解 1/2 时的酶蛋白量为 1 个 CAT 活性单位。

SOD 活性测定^[10]:反应液为 9 mL Tris-HCL 缓冲液(pH8.2)、0.1 mL 邻苯三酚和 $10 \mu\text{L}$ 酶液,室温下

进行测定,测定波长为 325 nm。酶活性单位定义为每 mL 反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量。

GST 活性测定^[11]:一个 GST 活力单位[U/mgPr)] 定义为每毫克蛋白质,扣除非酶反应,每分钟使 GSH 浓度下降 1 μmol · L⁻¹。

1.6 总蛋白测定

蛋白质含量用 Bradford 方法测定,以小牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白^[12]。

1.7 统计分析

试验结果表示为平均值 ± 标准误差 (mean ± SDE, n = 6)。使用 SPSS 统计软件和 ANOVA 法对组间数据进行差异性显著分析, P <0.05 表明差异显著, P <0.01 表明差异极显著。

2 结果

2.1 HC Orange No. 1 在鲫鱼肝脏中的富集

2.1.1 空白试验及回收率

3 份空白和 3 份空白添加标样的肝脏,按照上述前处理及分析方法进行分析,空白样品结果均为未检出,回收率结果大小如表 1。

表 1 回收率试验结果

Table 1 The recoveries of the chemical fortified in samples for the analytical method

肝脏样品	1	2	3
回收率/%	90.8	81.6	90.3

2.1.2 HC Orange No. 1 在鲫鱼肝脏中的富集

从图 1 可以看出,鲫鱼肝脏对 HC Orange No. 1 的富集呈先增加后减小的趋势,在第 10 d 时富集最强,到了第 16 d 左右肝脏富集量降低到暴露初期的富集水平。

2.2 HC Orange No. 1 对鲫鱼肝脏 GSH 含量的影响

从图 2 可以看出,与对照组相比,GSH 含量总体上被诱导,单因素方差分析结果表明差异显著 (P <0.01),并且随着暴露时间增加,诱导效应随之增

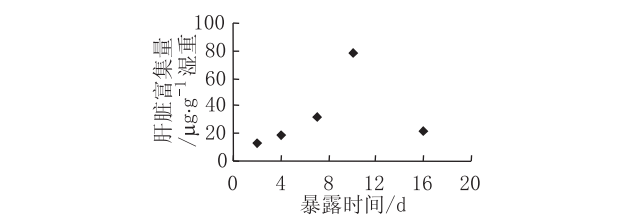


图 1 HC Orange No. 1 在鲫鱼肝脏中的富集
Figure 1 Accumulation of HC Orange No. 1 in liver of Carassius auratus

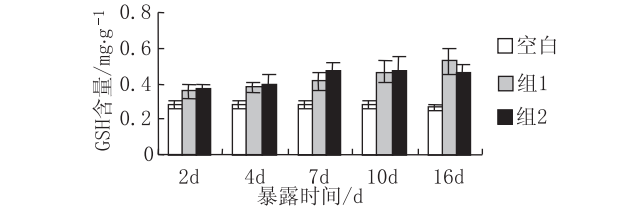


图 2 HC Orange No. 1 对鲫鱼肝脏 GSH 含量的影响
Figure 2 The Effects of HC Orange No. 1 on the contents of GSH in liver of Carassius auratus

强。暴露 2 d 时两个试验组的诱导率分别为 26.9% 和 30.9%,暴露 4 d 诱导率分别为 33.6% 和 39.5%,暴露 7 d 诱导率分别为 44.3% 和 66.3%,暴露 10 d 诱导率分别为 64.9% 和 66.8%,暴露 16 d 诱导率分别为 97.2% 和 71.6%。平行组间 GSH 含量没有显著性差异。

2.3 HC Orange No. 1 对鲫鱼肝脏 GST 活性的影响

从图 3 可以看出,GST 活性总体上也被诱导。暴露 2 d 时出现轻微诱导,诱导率分别为 29.6% 和 62.3%;之后诱导较显著 (P <0.05),露 4 d 时 GST 活性分别为对照组的 2.12 倍和 1.92 倍;暴露 7 d 时酶活性分别为对照组的 3.04 倍和 3.30 倍;暴露 10 d 时酶活性分别为对照组的 3.61 倍和 2.91 倍;暴露 16 d 后,GST 活性开始略微下降,分别为对照组的 1.86 倍和 1.73 倍。同样地,平行组间 GST 活性没有显著性差异。

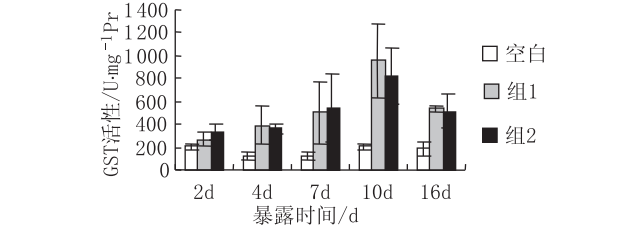


图 3 HC Orange No. 1 对鲫鱼肝脏 GST 活性的影响
Figure 3 The Effects of HC Orange No. 1 on the contents of GST in liver of Carassius auratus

2.4 HC Orange No. 1 对鲫鱼肝脏 CAT 活性的影响

如图 4,暴露 2 d 后 CAT 活性即被显著诱导 (P <0.05),暴露 4 d 时酶活性开始受到显著抑制,持续抑制数天后,CAT 逐渐被激活,从暴露 10 d 开始其活性回复到对照组水平,第暴露 16 d 又出现显著抑制 (P <0.01)。平行组间没有显著性差异。

2.5 HC Orange No. 1 对鲫鱼肝脏 SOD 活性的影响

从图 5 可以看出,暴露 2 d 后 SOD 活性先被轻微诱导,在暴露 4 d 左右受到极大诱导 (P <0.01)。暴露 4 d 和 7 d 时两个试验组的 SOD 活性分别是对照组的

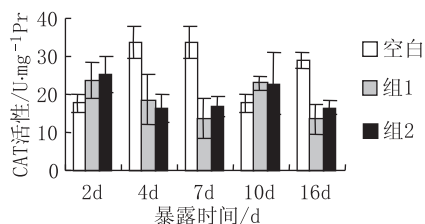


图 4 HC Orange No. 1 对鲫鱼肝脏 CAT 活性的影响

Figure 4 The Effects of HC Orange No. 1 on the contents of CAT in liver of *Carassius auratus*

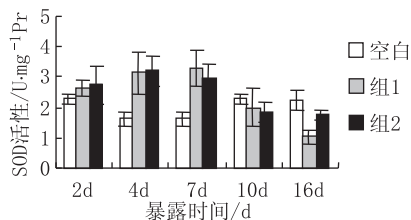


图 5 HC Orange No. 1 对鲫鱼肝脏 SOD 活性的影响

Figure 5 The Effects of HC Orange No. 1 on the contents of SOD in liver of *Carassius auratus*

0.92、0.95、1.01 和 0.80 倍。之后 SOD 活性开始逐渐下降,暴露 10d 酶活性值与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$),此后,随着暴露时间增加,酶活性继续降低,在暴露第 16 d 左右出现显著抑制 ($P < 0.05$)。平行组间基本上没有显著性差异。

3 讨论

抗氧化防御系统是需氧生物体内重要的活性氧清除系统,主要包括酶性清除剂抗氧化酶,如 SOD、CAT、GPx 等,以及小分子抗氧化剂,如 GSH、维生素 C、维生素 E 等。在正常生理条件下,动物体内代谢产生的活性氧可被抗氧化防御系统有效清除。但当机体暴露于可产生氧化还原污染的污染物时,若活性氧的产生速度超出了机体抗氧化防御系统的清除能力,就会对机体造成氧化胁迫,从而引发一系列毒性效应,如脂质过氧化、DNA 损伤、酶失活、甚至细胞死亡或癌变。早有研究报道,生物体内抗氧化成分会因污染胁迫的存在而改变^[5~7]。本次研究结果显示,不同暴露时间试验组中,鱼体肝脏抗氧化指标都呈现出较大变化,表明肝脏是 HC Orange No. 1 毒性作用的重要靶器官之一。

SOD 是生物体内唯一一种以自由基作为底物的抗氧化酶,可通过歧化反应消除超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$): $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$,从而阻止危害性很大的 $O_2^{\cdot-}$ 大量生成,是生物防护机制的中心酶。而 H_2O_2 可在 CAT 或 GPx 作用下分解为 H_2O 和 O_2 。本试

验中,暴露初期 SOD 活性先被诱导,说明 HC Orange No. 1 已进入鱼体肝脏内,并通过氧化还原代谢产生了大量的 $O_2^{\cdot-}$,大约从第 10 d 开始 SOD 活性受到抑制,这可能是由于随着暴露时间的增加,富集进入鱼体肝脏的化合物的量随着增加,化合物在鱼体肝脏代谢活动也越来越旺盛,代谢产生的氧自由基也越来越多,抗氧化防御系统已不能完全清除体内大量产生的氧自由基,机体受到氧化损伤,细胞结构受到一定程度的损伤,SOD 酶蛋白构象发生改变,从而 SOD 活性出现抑制,图 1 所示的结果一定程度上论证了这一点。王淑红等人研究了茼蒿、菲、苡对菲律宾蛤仔体内 SOD 活性的影响^[5],与本试验结果相似。类似地,暴露 2 d 时 CAT 活性就受到了诱导,反映了 H_2O_2 在鱼体肝脏内的累积,随后出现显著抑制,说明随着暴露时间的增加,鲫鱼肝脏受到 HC Orange No. 1 的损伤程度增大,可能对 CAT 酶蛋白产生了破坏或消耗。

活性氧清除剂 GSH 在抗氧化系统中占有非常重要的地位。作为自由基清除剂,GSH 能调节生物体内自由基浓度的平衡,在细胞抗活性氧自由基损伤的解毒代谢中起着重要作用。与抗氧化酶一样,大量的活性氧可诱导 GSH 的合成,可以说,细胞内 GSH 的含量可以从一个侧面表征生物所处的环境状况,其含量的变化是生物对环境状况的一种应激反应,对生物本身具有保护作用。当 GSH 含量明显上升,说明了环境中污染物的浓度增加,此时细胞内解毒系统被诱导。由于这种应激反应是发生在细胞内分子水平上,其变化要比生物的生长繁殖指标更为灵敏。Stein 等从野外多个污染程度各异的水体取样,测定其中水生生物体内 GSH 的含量。结果表明,GSH 能够准确地表征不同水体污染程度的差异,可能作为生物标志物^[13]。本文的研究表明, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HC Orange No. 1 已对鲫鱼构成了氧化胁迫,从暴露 2 d 到 16 d,鲫鱼肝脏 GSH 含量较对照组都有明显增大,并且随着暴露时间的增加,GSH 诱导率与暴露时间呈线性正相关 ($r^2 = 0.9784$)。说明通过暴露实验,HC Orange No. 1 可能在鲫鱼体内富集并发生代谢,产生自由基等一系列有害中间体,鲫鱼通过体内 GSH 的含量增加可以加强自身的抗氧化能力,消除氧自由基,减轻 HC Orange No. 1 对机体的损害。且随着暴露时间的增加,HC Orange No. 1 在鲫鱼肝脏内富集的量随之增加,代谢能力也随之增强,产生的自由基等一系列中间体的量也随之增加,因而 GSH 诱导率与暴露时间呈线性正相关。综上所述,鲫鱼肝脏对 HC Orange No. 1 的代谢过程中产生了

氧化还原循环,使得活性氧浓度显著升高,从而导致细胞内膜系统的氧化损伤,这可能是 HC Orange No. 1 对鲫鱼的重要致毒机制之一。

GST 以同工酶的形式广泛存在于动植物体中,是一种重要的解毒酶,能催化 GSH 与许多次级底物结合,包括脂质过氧化的次级产物,从而解除内源性或外源性毒物的毒性。外源性化合物 HC Orange No. 1 及其代谢产物在有机体内的去毒过程和排泄过程中均与 GST 有密切关联,正是由于 GST 在生物转化过程中的独特功效,鲫鱼肝脏中 GST 活性的增加可能表示鱼体内相应的防御外源性物质机制的建立,本研究结果中不同暴露时间的 GST 活性都显著增加,充分说明了这一点,且同 GSH 一样,随暴露时间的增加 GST 的诱导率也随之增加,其原因也与上述分析相似。此外,GST 活性的增加往往会伴随着肝脏中 GSH 水平的增加,本试验结果也与之相符。许多报道表明,GST 确实是一种高诱导性酶,具有广泛的作用底物,有机、无机化合物均可诱导其活性。在水生动物体内 GST 可被 2,4-二氯酚诱导,其活性显著高于对照组^[7]。Chen 等人通过研究也发现,金属的长期暴露会对鱼类肝脏的 GST 活性产生显著诱导^[14]。

4 结论

(1)鲫鱼肝脏对 HC Orange No. 1 的富集呈先增加后减小的趋势,在第 10d 时富集最强。

(2)鱼体肝脏中 GST、GSH、CAT 和 SOD 对 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HC Orange No. 1 都非常敏感。GSH 含量总体上被诱导,并且随着暴露时间的增加,诱导逐渐增强。GST 活性总体上也是被诱导。CAT 和 SOD 活性则是先受到诱导,随后受到抑制。

(3)鲫鱼肝脏对 HC Orange No. 1 的代谢过程中产生了氧化还原循环,使得活性氧浓度显著升高,从而导致细胞内膜系统的氧化损伤,这可能是 HC Orange No. 1 对鲫鱼的重要致毒机制之一。

(4)鱼体肝脏的抗氧化响应从酶学及分子水平上反映了污染物对鱼体肝细胞的损伤,可考虑作为水环境中 HC Orange No. 1 污染的生物监测指标,为此需要

进行更多的野外试验论证。

参考文献:

- [1] Steinberg C E W, Geyer H J, Ketrup AAF, et al. Evaluation of xenobiotic effects by ecological techniques[J]. *Chemosphere*, 1994, 28(2): 357 - 374.
- [2] 吕冬梅,浦跃朴. 染发剂毒性作用的研究进展[J]. 铁道劳动安全与环保, 2000, 27(4): 214 - 218.
- [3] Susan N J Pang, Monice Zondlo Fiume. Final report on the safety assessment of HC Orange No. 1[J]. *International Journal of Toxicology*, 1998, 17(4): 21 - 37.
- [4] Di Giulio R T, Washburn P C, Wenning R J, et al. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress[J]. *Environ Toxicol and Chem*, 1989, 8(12): 1103 - 1123.
- [5] 王淑红,王新红,陈荣,等. 荧蒽、菲、芘对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)超氧化物歧化酶的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版)2000, 39(4): 504 - 508.
- [6] J F Zhang, X R Wang et al. Effects of Long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of Fish[J]. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 2003, 71(2): 234 - 239.
- [7] 张景飞,王晓蓉. 低浓度 2,4-二氯酚对鲫鱼肝脏抗氧化系统影响的初步研究[J]. 中国环境科学, 2003, 23(5): 531 - 534.
- [8] Hissin P J, Hilf R A. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues[J]. *Anal Biochem*, 1976, 74(1): 214 - 226.
- [9] 徐镜波,袁晓凡,郎佩珍. 过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度法测定[J]. 环境化学, 1997, 16(1): 73 - 76.
- [10] 邹国林,桂兴芬,钟晓凌,等. 一种 SOD 的测活方法-邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, (4): 71 - 73.
- [11] 毛德寿,同宗灿,王志远,等. 环境生化毒理学[M]. 沈阳:辽宁大学出版社, 1986. 151.
- [12] 叶伟民,韩焕兴,范列英,等. Bradford 比色法简便、快速测定微量蛋白[J]. 上海医学检验杂志, 1996, 11(4): 207 - 208.
- [13] Stein J E, Collier T K, Reichert W L, Casillas E, Hom T, Varanasi U. Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects: studies with benthic fish in Puget Sound, Washington[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1992, 11(5): 701 - 714.
- [14] Chen Guosheng, Xu Ying, Xu Lihong, Zhang Yongyuan, et al. Influence of dioxin and metal-contaminated sediment on Phase I and II biotransformation enzymes in silver crucian carp[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1998, 40(3): 234 - 238.