

# KRYOKIRURGI – ALTERNATIV VID PROSTATCANCER

**Kryokirurgi, en perkutan, minimalinvasiv metod för behandling av lokaliserad prostatacancer, har prövats vid Östra sjukhuset sedan maj 1995. Hittills har 37 patienter behandlats och biverkningarna har varit acceptabla. Vid uppföljning var prostataspecifikt antigen i serum under 1 ng/ml hos 26 av 37 patienter, dvs 70,3 procent – nedre detektionsgräns är 0,5 ng/ml. Kontrollbiopsier var utan tecken på kvarvarande malignitet hos 23 av 29 (79,3 procent).**

**Resultaten talar för att metoden är en väl fungerande behandlingsform.**

Kryokirurgi – frysbehandling med flytande kväve – av prostatakörteln på människa presenterades första gången 1966 [1]. Man använde då en fryssond som fördes in via uretra, och indikation var vanligtvis avflödeshinder från urinblåsan på grund av förstörd prostata. Komplikationer förekom relativt ofta, vanligast var avstötning av den sönderfrysta vävnaden via uretra (s k sloughing), men även fistlar mellan urinblåsan och rektum finns beskrivna.

För att bättre komma åt den yttre delen av prostatakörteln (perifera zonen) och på det viset kunna behandla prostatacancer började Flocks och medarbetare 1972 att använda en metod där frysningen skedde efter friläggning av prostata via en perineal incision [2]. Man flyttade sonden efter hand och fryste på detta vis hela prostatan, samt vid behov även delar av vesicula seminalis. Ut-

bredningen av frysningen kontrollerades visuellt, men man hade fortfarande problem med fistlar och till viss del också med sloughing.

## Likvärdigt med ektomi

Behandlingsresultaten från dessa »öppna» kryokirurgiska ingrepp var dock ganska bra. I den mest citerade kliniska serien av Bonney och medarbetare rapporteras resultatet stadium för stadium vara likvärdiga med radikal prostatektomi [3]. Dock fick många patienter (30–84 procent) i denna serie samtidig hormonell behandling, vilket gör resultaten svårvärderade. I en österrikisk serie omfattande 101 patienter bedömdes 47 patienter ha intrakapsulär tumör (stadium B eller T2). I denna undergrupp var femårsöverlevnaden över 90 procent, och ingen hade kvarvarande tumör vid transuretral eller perineal biopsi tre månader efter kryokirurgi [4]. I många av dessa serier behandlades även patienter med metastaserande sjukdom i syfte att uppnå lokal palliation.

Resultaten från de tidigare studierna tyder på att det fanns en potential för att använda kryokirurgi vid behandlingen av prostatacancer men att komplikationsfrekvensen var relativt hög. Detta berodde till största delen på svårigheter att kontrollera frysskadans utbredning samt på att även uretra skadades vid behandlingen.

Den medicintekniska utvecklingen gick snabbt framåt, och 1988 visade Onik och medarbetare att man kunde visualisera frysskadans utbredning med ultraljud. Man visade också att isbollen som utbredde sig och som man såg på ultraljudet motsvarades av celldöd i samma område [5]. Därmed fanns förutsättningarna för att styra frysningen mer exakt, och ur dessa utvecklades den moderna kryokirurgin av prostata.

Modern kryokirurgi är en perkutan, minimalinvasiv behandlingsmetod som utförs under vägledning av transrektalt ultraljud (TRUL). Operationen sker i generell anestesi eller spinalbedövning och patienten ligger i benstöd. En cystoskopi görs för att utesluta patologi i uretra eller blåsa. Med fylld blåsa görs en suprapubisk punktion, och en tunn

(10 F) suprapubisk kateter anbringas. Därefter placeras en uretravärmare i form av en dubbellumen-kateter där 37-gradigt vatten cirkulerar i ett slutet system under hela operationen (Figur 1). Syftet är att skydda uretraslemhinnan och sfinktern mot frysskada, detta för att minska komplikationerna, framför allt i form av sloughing. Från och med det skedet sker hela operationen med hjälp av transrektalt ultraljud.

Efter volymbestämmning av prostatan punkteras denna via perineum, och J-vajrar placeras där man önskar placera sina fryssonder (Figur 2). Över dessa trår operatören dilatatorer med plasthylsor. Fryssonderna anbringas via dessa plasthylsor och fastfrysas på plats vid  $-50^{\circ}\text{C}$ . I allmänhet placeras fem sonder och dessa fixeras på plats med band (Figur 3).

I det skedet börjar själva frysbehandlingen, och ett exempel på hur det kan se ut på ultraljudsbilden visas i Figur 4. Frystemperaturen och flödet av flytande kväve till varje individuell sond styrs via kontrollpanelen på kryomaskinen. Frysningen avbryts först när man frusit flera millimeter utanför prostata och in i yttre delen av rektalväggen.

Just relationen till rektalväggen är känslig och därför använder vi färgdoppler för att kontrollera blodcirkulationen i rektalväggen när man börjar närma sig de sista kritiska millimetrarna. En frysning igenom hela rektalväggen innebär en risk för fistel mellan urinblåsan och rektum, en med rätta fruktad komplikation. Efter att prostatan tinats upp helt görs en andra frysning, eventuellt efter justering av sonders läge. Efter ytterligare en upptining avlägsnas sondersna, de små incisionerna sys över, uretravärmaren avlägsnas och patienten lämnar operationssalen med sin suprapubiska blåskateter. De flesta patienterna kan lämna sjukhuset dagen efter operationen.

## Hur frysning orsakar celldöd

Frysning är vår mest använda metod för konservering; hur kan den då användas för destruktion av tumör? Mekanismen bakom celldöd vid frysbehandling beskrivs schematiskt i Faktaruta 1.

För att uppnå den önskade effekten

## Författare

GUNNAR AUS

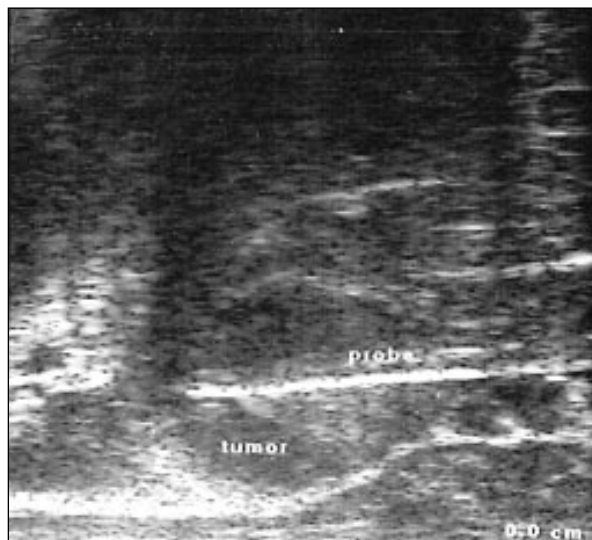
med dr, specialistläkare

JONAS HUGOSSON

docent, överläkare; båda vid urologsektionen, kirurgkliniken, Östra sjukhuset, Göteborg.



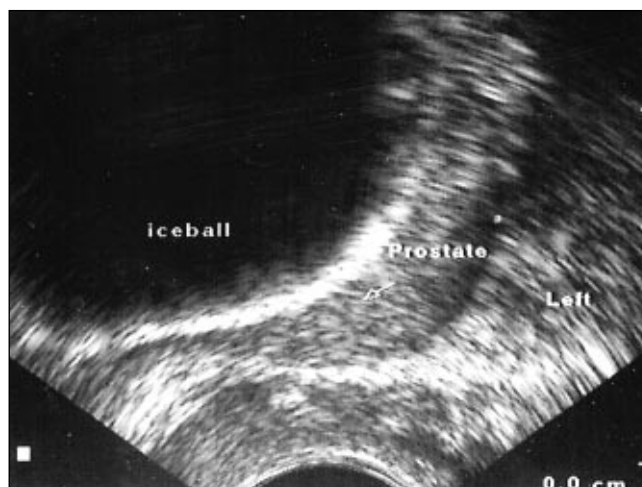
**Figur 1.** Bilden visar den suprapubiska katetern (A) och uretravärmaren (B) på plats.



**Figur 2.** Ultraljudsbild som visar perineal punktion av prostata för placering av frys-sonderna. Längdsnitt.



**Figur 3.** Kryosonderna på plats i prostata. De sitter på detta vis under hela ingreppet.



**Figur 4.** Isbollens utbredning ses tydligt som en hypoekogen förändring. Relationen till rektum och prostata är lätt att se.

fördras en snabb nedfrysning, och detta förutsätter att man använder flytande (ej gasformigt) kväve under hela behandlingen. Uppfrysningen sker relativt långsamt. Dubbelfrysning ökar cellskadan, vilket har visats vid frysning av levertumörer men också vid prostatacancer i form av mindre andel positiva kontrollbiopsier [6, 7].

### Resultatet av kryokirurgi

Vi har använt kryokirurgi med ovan beskrivna teknik sedan maj 1995. Hittills har 37 patienter behandlats i en fas II-studie som godkänts av forskningsetiska kommittén vid Göteborgs universitet. Studiens huvudsyfte har varit att utvärdera förmågan till lokal kontroll av prostatacancer och biverkningar. Vi har endast behandlat patienter utan påvisade metastaser (stadium M0). Utvärderingen har skett med frågeformulär samt vid täta återbesök.

Tumörfrihet lokalt i prostata har värderats med fyra till sex mellansbiopsier av prostataresten omkring fyra till sex månader efter behandlingen samt

med serum-PSA (prostata-specifikt antigen).

Alla patienter behandlades med samma kryoapparat (CMS AccuProbe 450, B&K Medical AB). Ultraljundsundersökningar gjordes med en B&K model 3535 ultraljudsmaskin och en för ändamålet specialkonstruerad ultraljuds sond som innehöll ett böjt ljudhuvud, »curved array», för transversell undersökning och ett rakt ljudhuvud, »linear array», för longitudinell undersökning. Denna sond ger möjlighet till dopplerundersökning i båda undersökningsplanen och har också en punktionsguide för perkutan punktion av prostata.

Medelåldern för de behandlade var 68,5 (50–78) år och alla patienter var i stadium M0. Elva patienter hade fått lymfkörtlarna utrymda (med negativa fynd) och 26 patienter var ej utrymda på grund av förmodad låg risk för lymfkörtelmetastaser (serum-PSA under 20 ng/ml och hög eller medelhög differentieringsgrad). Dock hade en patient med PSA på 47 ng/ml samt två patienter med

låg differentierade tumörer ej genomgått lymfkörtelutrymning. Lokal tumörutbredning (T-stadium) varierade från T1b–T4a. 14 av patienterna hade högt, 15 medelhögt och åtta lågt differentierade tumörer. Serumhalten av PSA före behandling var i medeltal 18,2 (1,1–100; median 11,0) ng/ml. Två patienter hade recidiv efter strålbehandling och fyra hade genomgått transuretral resektion.

### Hormonell förbehandling

26 av de 37 patienterna (70,3 procent) hade erhållit hormonell förbehandling med GnRH-analog under minst tre månader för att minska prostatas volym. All hormonell behandling avslutades i samband med kryobehandlingen utom hos en patient.

Uppföljningstiden varierar från tre till tolv månader. Detta medför att åtta patienter ännu inte är biopsade men att allvarliga biverkningar skulle ha hunnit visa sig. Operationstid, vårdtid, blödning och postoperativt resultat beskrivs i Faktaruta 2.

## FAKTARUTA 1

Schematisk beskrivning av mekanismen för celldöd vid frysning med flytande kväve.

1. Extracellulär frysning, vilket resulterar i intracellulär dehydrering och ökande koncentration av elektrolyter.

2. Intracellulär frysning åtföljd av metabola störningar.

3. Bildningen av små iskristaller skadar cellmembran och cellorganeller mekaniskt.

4. Vid upptinandet råder ett hyperosmolärt tillstånd intracellulärt. Vatten rusar in i cellen och åstadkommer celldöd genom att cellmembranet brister.

5. Frysningen orsakar trombbildning i blodkärlen vilket leder till hypoxi och ytterligare metabola störningar.

Det postoperativa förloppet präglas av den svullnad som uppstår i operationsområdet och som ofta sekundärt ger upphov till svullnad i skrotum och penis. Denna svullnad av prostata gör att patienten är beroende av suprapubisk kateter under den första tiden efter operationen. Postoperativt förlopp och komplikationer är beskrivna i Faktaruta 3.

## 24 var utan besvär

Urinvägsinfektioner var vanliga men utgjordes i många fall av asymtomatisk bakteriuri, som diagnostiserades vid rutinmässiga odlingar. Även symtomgivande prostatiter/epididymiter förekom. Vid genomgång i juni månad uppgav 24 patienter att de inte hade några besvär efter behandlingen, tio angav lätta besvär (mest penil känselnedsättning och urinträngningar) och två patienter hade svåra besvär (inkontinens).

Det är ett kliniskt intryck att de första veckorna/månaderna kan vara besvärliga med framförallt trängningar som kan leda till urgeinkontinens. Dessa besvär har i alla fall utom två avtagit och försvunnit med tiden. I de två fall som har kvarstående inkontinens är den snarast av typen stressinkontinens. Båda patienternas besvär har förbättrats med tiden, men de använder fortfarande inkontinensskydd dagtid.

## Diskussion

Kryokirurgi har använts vid många andra tumörformer [8]. En förutsättning för framgångsrik behandling är att frysskadans utbredning kan relateras till tumörens lokalisering. Även om vi inte med säkerhet kan lokalisera utbredningen av prostatacancer exakt inom körteln kan själva körteln och dess begränsning väl ses med transrektalt ultraljud. Därmed finns de tekniska förut-

sättningarna för kryokirurgi vid tumörer i detta organ. Flera studier från USA har visat på bra korttidsresultat efter frysbehandling med modern, perkutan teknik. Mellan 75 och 92 procent av patienterna har negativa biopsier efter tre månader, och 35–55 procent har omätbart serum-PSA (mindre än 0,5 ng/ml) vid denna tidpunkt [9-11].

Det är möjligt att upprepa behandlingen om man finner kvarvarande tumör i kontrollbiopsin. Cohen och medarbetare följde 239 patienter i minst två år. I denna serie hade 69 procent negativa biopsier efter en behandling, och man kom upp till 82 procent negativa biopsier när vissa patienter med kvarvarande tumör genomgått ytterligare en frysbehandling. I deras serie hade 60 procent omätbart PSA och 77 procent hade mindre än 1 ng/ml efter två år. Patienter som erhållit hormonell förbehandling hade ett något sämre resultat med 40 procent mätbart PSA och 69 procent hade mindre än 1 ng/ml [12]. En möjlig förklaring till de något sämre resultaten efter hormonell förbehandling är att det var patienter med större tumörbörda och högre PSA-värden som fått sådan behandling [12].

Alla publicerade resultat har dock inte varit lika bra. Grampsas och med-

## FAKTARUTA 2

Operations- och vårdtid samt resultat av kryokirurgi vid Östra sjukhuset, Göteborg. Patientantal 37, medelvärden och spridning är angivna.

Operationstid 148 (119–170) minuter

Frystid 34 (11–55) minuter

Vårdtid 1,2 (1–5) dagar, 32 av 37 patienter lämnade sjukhuset dagen efter operationen

Blödning mindre än 100 ml

Uppföljningstid 6 (3–12) månader

Senaste PSA-värde 1,2 (0,1–8,2) ng/ml

23 av 37 (62,2 procent) hade PSA under 0,5 ng/ml

26 av 37 (70,3 procent) hade PSA under 1 ng/ml

33 av 37 (89,2 procent) hade PSA under 4 ng/ml

Biopsi efter operation: 23\* av 29 (79 procent) hade negativa biopsier efter en behandling

5\* av 29 (17 procent) hade kvarvarande cancer

1 av 29 (4 procent) hade biopsi med misstanke om cancer. PSA var endast 0,2 ng/ml

\* En patient med kvarvarande tumör fick en andra behandling. Förnyad biopsi visade ingen kvarvarande tumör efter andra behandlingen. Åtta patienter är ännu ej biopsierade; sju av dem har omätbart PSA och en patient 0,5 ng/ml.

## FAKTARUTA 3

Postoperativt förlopp och komplikationer till kryokirurgi vid Östra sjukhuset, Göteborg. Patientantal 37.

Långvarig retention/sloughing 8  
Transuretral resektion (av död vävnad) 3

UVI (inklusive prostatit/epididymit) 12

Skrotal svullnad 26

Penil känselnedsättning 9

Inkontinens 6

Bestående inkontinens 2

Blåsp perforation 1

Parafimos 1

Fistlar 0

En patient kan ha haft flera biverkningar. Blåsp perforationen åstadkoms när uretravärmaren skulle placeras. Blåsan läkte utan komplikationer med kateterbehandling.

arbetare utförde radikal prostatektomi på sex patienter som hade positiva biopsier efter frysbehandling och fann utbredd kvarvarande tumörväxt, även inom det område som varit fruset enligt ultraljudsbilden [13]. En möjlig förklaring är att man använt enkelfrysteknik med en alltför kort behandlingstid, 5–15 minuter, vilket kan jämföras med de 34 minuter vi behandlat i Göteborgsstudien (Faktaruta 2).

När det gäller våra behandlingsresultat är PSA-utfallet svårt att utvärdera eftersom den preoperativa hormonbehandlingen fortfarande kan ha en viss inverkan på PSA-värdet, även om denna avslutats vid operationen. Kvarstående mätbara halter av PSA kan komma ifrån periuretrala körtlar som skonats genom användandet av uretravärmaren. Det förefaller dock som om våra resultat är jämförbara med dem som presenterats i litteraturen. Andelen negativa biopsier efter behandling (omkring 80 procent) är även den jämförbar med internationella studier. Det förefaller sålunda som om kryobehandlingen har förutsättningar för att uppnå lokal bot hos ända upp till 80 procent av patienterna.

## Komplikationer

Komplikationsfrekvensen skiljer sig åt betydligt mellan olika studier i litteraturen, mest beroende på vilken typ av patienter som behandlats och om man använt uretravärmare eller ej [14]. I studier med patienter som inte fått någon annan behandling rapporteras ofta låga komplikationssiffror [12], medan komplikationsfrekvensen för patienter som fått recidiv efter strålbehandling närmar sig 100 procent [15]. Det finns ett antal faktorer som ökar risken för komplikationer (se Faktaruta 4).

Impotens är ett speciellt problem när

#### FAKTARUTA 4

Risikfaktorer för komplikationer efter kryobehandling av prostata.

Tidigare genomgången strålbehandling  
Icke fungerande uretravärmare  
Stor prostatakörtel (över 60 gram)  
Tidigare genomgången transuretral resektion

det gäller behandlingen av prostatacancer. Det finns rapporter som indikerar att impotens är vanlig men att den kan vara övergående. I en studie omfattande 83 patienter rapporteras att alla patienter fick tillbaka någon form av sexuell funktion efter ingreppet [16]. Vi har haft svårt att värdera potensen då många av våra patienter var impotenta före ingreppet, i många fall på grund av genomgången hormonell behandling. Vi informerar om att metoden medför en hög risk för impotens men att vi idag inte vet exakt hur stor denna risk är.

Om man räknar med en retention på högst tre veckor, skrotal svullnad och en viss penil känslighetsnedsättning som normalförlopp hade cirka två tredjedelar av våra patienter ett normalt postoperativt förlopp medan var tredje patient hade mer besvär än förväntat. Det vanligaste bekymret var förlängd retention eller sloughing. Trots ett längre postoperativt förlopp är det endast två patienter av 37 som har kvarstående svåra besvär efter behandlingen. Då uppföljningstiden är kort hoppas vi på fortsatt förbättring även hos dessa patienter.

#### Jämförelse med andra metoder

Hur står sig kryokirurgi vid en jämförelse med radikal prostatektomi och extern strålbehandling? Först skall sägas att jämförelser när det gäller långtidsöverlevnaden endast kan göras i randomiserade studier, och sådana saknas idag. Behandlingar enligt ovan är av mycket olika karaktär, har olika bieffekter och är sannolikt lämpade för olika patientkategorier.

Efter radikal prostatektomi får ca 30 procent av patienterna biokemiskt påvisat recidiv, dvs mätbar serumhalt av PSA, inom tio år [17]. Detta innebär inte att alla dessa patienter hinner utveckla kliniskt recidiv under sin återstående livstid.

Extern strålbehandling liknar kryokirurgi mera såtillvida att man inte tar bort det sjuka organet. Detta innebär också att man inte kan kräva omätbart PSA då kvarvarande benign eller periuretral vävnad kan producera mätbara halter av PSA i blod. Ett stigande PSA-värde eller kvarvarande tumörvävnad vid biopsi efter behandling betraktas dock som terapivikt vid båda behand-

lingsmetoderna. Vid strålbehandling måste man vänta med biopsin i minst 18 månader efter behandling för att kunna göra en meningsfull värdering.

I en studie där man följde upp patienter med PSA efter extern strålbehandling visade 80 procent stigande värden inom fem år [18]. Andelen positiva biopsier efter strålbehandling varierar, men siffror runt 60 och ända upp till 90 procent har presenterats [19, 20]. Antalet biopsier och hur länge efter behandling som biopsierna tas måste tas med i beräkningen när man värderar olika se-

#### Sammanfattning

Våra initiala resultat (80 procent negativa biopsier) talar för att kryokirurgi kan ha en plats vid behandlingen av lokaliserad prostatacancer. Till metodens fördelar hör dess minimalinvasiva karaktär med kort vårdtid och ett gynnsamt, om än något långdraget, postoperativt förlopp samt en relativt låg behandlingsskostnad. Sjukhusets pris för behandlingen är idag beräknat till ca 25 000 kronor.

Komplikationerna är acceptabla för en nyetablerad tumörbehandling, vid vilken man måste ta viss hänsyn till att våra data inkluderar en ofrånkomlig inlärningsfas. Ytterligare en fördel är att metoden inte är beroende av att tumören håller sig innanför prostatas kapsel då frysskadan även sträcker sig extraprostatiskt. Till nackdelarna får räknas en hög investeringskostnad och att det fordras tämligen stor erfarenhet av transrektalt ultraljud för att kunna genomföra behandlingen optimalt.

Behandlingen av lokaliserad prostatacancer förbättras hela tiden med bättre kirurgiska metoder, förbättring av strålbehandlingen med noggrann styrning av strålfältet och tillägg av interstitiell strålbehandling, och nya behandlingsmetoder, som kryokirurgi och fokuserat ultraljud, börjar också provas. Kryokirurgins framtida plats i behandlingsarsenalen är svår att förutsäga vid dags dato, och det förefaller i första hand som om en jämförelse med strålbehandling när det gäller resultat, kostnader, biverkningar och livskvalitet vore av värde.

På längre sikt kan man skönja en utveckling mot att tumörer diagnostiseras allt tidigare. Att i tidiga fall av prostatacancer kunna rikta sin vävnadsdestruktion mot det område som hårbärgerar tumör och därmed undvika behandling av hela prostatakörteln ter sig inte långre som en utopi.

#### Referenser

1. Gonder MJ, Soanes WA, Schulman S. Cryosurgical treatment of the prostate. *Investigative Urology* 1966; 3: 372-8.

- Flocks HH, Nelson CMK, Boatman DL. Perineal cryosurgery for prostatic carcinoma. *J Urol* 1972; 108: 933-5.
- Bonney WF, Fallon B, Gerber WL, Hawtrey CE, Loening SA, Narayana AS et al. Cryosurgery in prostate cancer: Survival. *Urology* 1982; 19: 37-42.
- Kunit G. Open perineal cryosurgery in carcinoma of the prostate - A possible curative alternative. *Urol Res* 1986; 14: 3-7.
- Onik G, Cobb C, Cohen J, Zabkar J, Porterfield B. US characteristics of frozen prostate. *Radiology* 1988; 168: 629-31.
- Rubinsky B, Lee CY, Bastacky J, Onik GM. The process of freezing and the mechanism of damage during hepatic cryosurgery. *Cryobiology* 1990; 27: 85-97.
- von Eshenbach AC. Results of a phase I/II study of cryablation for recurrent carcinoma of the prostate: The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience. *J Urol* 1995; 153: 503A.
- Gage A. Cryosurgery in the treatment of cancer. *Surg Gynecol Obstet* 1992; 174: 73-92.
- Bahn DK, Lee F, Solomon MH, Gontina H, Klionsky DL, Lee FT. Prostate cancer: US-guided percutaneous cryoablation; work in progress. *Radiology* 1995; 194 (2): 551-6.
- Miller RJ, Cohen JK, Merlotti LA. Percutaneous transperineal cryosurgical ablation of the prostate for the primary treatment of clinical stage C adenocarcinoma of the prostate. *Urology* 1994; 44: 170-4.
- Onik GM, Cohen JK, Reyes GD, Rubinsky B, Chang Z, Baust J. Transrectal ultrasound-guided percutaneous radical cryosurgical ablation of the prostate. *Cancer* 1993; 72: 1291-9.
- Cohen JK, Miller RJ, Rooker GM, Shurhan BA. Cryosurgical ablation of the prostate: Two year PSA and biopsy results. *Urology* 1996; 47: 395-401.
- Grampsas SA, Miller GJ, Crawford ED. Salvage radical prostatectomy after failed transperineal cryotherapy: Histologic findings from prostate whole-mount specimens correlated with intraoperative transrectal ultrasound images. *Urology* 1995; 45: 936-41.
- Cox RL, Crawford ED. Complications of cryosurgical ablation of the prostate to treat localized adenocarcinoma of the prostate. *Urology* 1995; 45: 932-5.
- Bales GT, Williams MJ, Sinner M, Thisted RA, Chodak GW. Short-term outcomes after cryosurgical ablation of the prostate in men with recurrent prostate carcinoma following radiation therapy. *Urology* 1995; 46: 676-80.
- Wieder J, Schmidt JD, Casola G, Van Sonnenberg E, Stainken BF, Parsons CL. Transrectal ultrasound-guided transperineal cryoablation in the treatment of prostate carcinoma: Preliminary results. *J Urol* 1995; 154: 435-41.
- Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: Results at 10 years. *J Urol* 1994; 152: 1831-6.
- Stamey TA, Ferrari MK, Schmid HP. The value of serial prostate specific antigen determinations 5 years after radiotherapy: Steeply increasing values characterize 80 percent of patients. *J Urol* 1993; 150: 1856-9.
- Freiha FS, Bagshaw MA. Carcinoma of the prostate: Results of post-irradiation biopsy. *Prostate* 1984; 5: 19-25.
- Kabalin JN, Hodge KK, McNeal JE, Freiha FS, Stamey TA. Identification of residual cancer in the prostate following radiation therapy: Role of transrectal ultrasound guided biopsy and prostate specific antigen. *J Urol* 1989; 142: 326-31.