

# Valutazioni radiografiche della guarigione ossea spontanea di lesioni cistiche mascellari e mandibolari dopo enucleazione con tecniche piezoelettriche

• Fabrizio Carini  
• Giovanni Lomartire  
• Fabio Greco  
• Dario Monai  
• Massimiliano Ciaravino

*Università degli Studi di Milano-Bicocca,  
Facoltà di Medicina e Chirurgia,  
Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche,  
Clinica Odontoiatrica, Direttore prof. Marco Baldoni*

La cistectomia rappresenta la tecnica d'elezione per il trattamento delle lesioni cistiche mascellari e mandibolari. La letteratura si trova concorde nel ritenere che l'accurata enucleazione delle cisti di piccole dimensioni insieme a una scrupolosa toelette chirurgica, non associata a riempimento della cavità residua con biomateriali, siano sufficienti a garantire una rigenerazione ossea soddisfacente.

Per quanto concerne le cavità di medie e grandi dimensioni, definite dalla classificazione proposta da Horowitz<sup>1</sup> nel 1989, non esiste un consenso unanime sui protocolli terapeutici, ma differenti proposte alternative alla sola rigenerazione spontanea.

Per il trattamento delle cavità di grandi dimensioni sono state descritte tecniche che prevedono l'utilizzo di biomateriali, osso autologo e combinazioni di questi

materiali. Molti studi hanno dimostrato, con controlli clinico-radiografici a distanza di tempo, che cavità residue di grandi dimensioni possono andare incontro, nella totalità dei casi, a rigenerazione spontanea<sup>2-7</sup>.

Scopo del presente lavoro è stato quello di presentare i dati ottenuti dal confronto delle radiografie acquisite, a distanza di tempo e con metodo digitale, dell'evoluzione della guarigione

## Riassunto

La cistectomia rappresenta la tecnica d'elezione per il trattamento delle lesioni cistiche mascellari e mandibolari. Molti studi hanno dimostrato, con controlli clinico-radiografici a distanza di tempo, che cavità residue di grandi dimensioni possono andare incontro nella totalità dei casi a rigenerazione spontanea. Obiettivo della ricerca è stato quello di presentare i dati ottenuti dal confronto delle radiografie acquisite a distanza di tempo con metodo digitale dell'evoluzione della guarigione spontanea dopo cistectomia attraverso tecniche mini-invasive e senza l'utilizzo di nessun tipo di materiale di innesto. Il presente studio ha interessato 28 pazienti (12 femmine e 16 maschi) di età compresa tra 13 e 72 anni. È stata utilizzata una tecnica minivasiva con Piezosurgery® per l'ostectomia. Il protocollo di ricerca prevedeva controlli clinico/radiografici pre e post-operatori (T0) e a distanza di 6 (T1), 12 (T2) e 24 (T3) mesi dalla chirurgia. L'acquisizione delle radiografie è stata fatta attraverso una digitalizzazione per mezzo di uno scanner retroilluminato (Mustek A3IIT). Abbiamo valutato la rigenerazione ossea attraverso la variazione dimensionale dell'area operata mediante l'utilizzo un software (Adobe Photoshop CS2) che ha permesso di calcolare l'area residua dopo aver delimitato il perimetro manualmente su monitor. L'analisi dei valori medi delle aree residue indica una riduzione a 6, 12 e 24 mesi rispettivamente del 15,13%, 49,48% e 83,73%. È possibile concludere che si è ottenuta una rigenerazione ossea spontanea apprezzabile e con un livello di riossificazione elevato senza utilizzare alcun materiale di riempimento. I dati raccolti nella presente indagine clinica suggeriscono che il sistema osteotomico minivasivo con bisturi Piezoelettrico® è da considerarsi biologicamente rispettoso dei tessuti. La procedura chirurgica permette di ridurre anche i rischi e le complicanze post-operatorie.

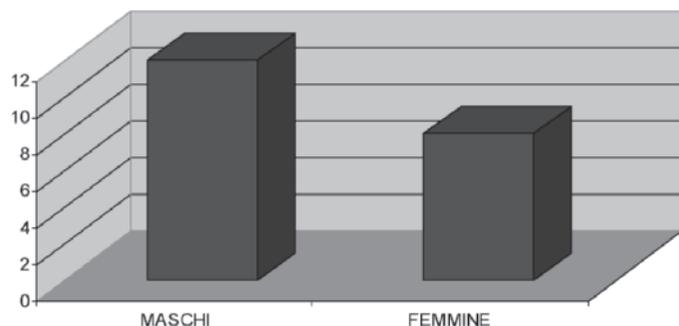
## Summary

Summary Summary Summary

● **PAROLE CHIAVE:** lesioni cistiche, cistectomia

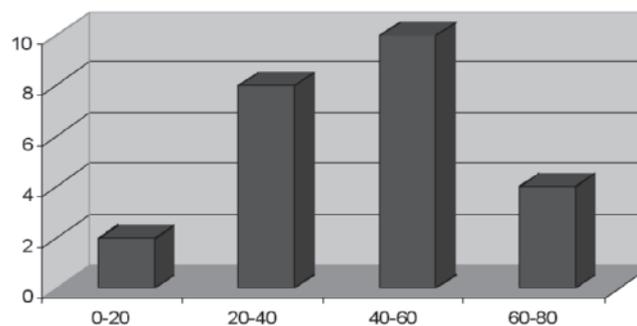
● **KEYWORDS:** causal therapy, full mouth disinfection

**DISTRIBUZIONE DEI PAZIENTI IN BASE AL SESSO**



**1. Distribuzione dei pazienti in base al sesso.**

**DISTRIBUZIONE ANAGRAFICA DEI PAZIENTI**



**2. Distribuzione anagrafica dei pazienti per classi di età.**

spontanea dopo cistectomia attraverso tecniche mini-invasive e senza l'utilizzo di nessun tipo di materiale di innesto.

## Materiali e metodi

Il presente studio è stato condotto nel periodo compreso tra il 2002 e il 2006 e ha interessato 28 pazienti (12 femmine e 16 maschi), di età compresa tra 13 e 72 anni (età media 46,9) (figure 1 e 2).

I pazienti si sono presentati alla nostra attenzione nel reparto di Chirurgia Orale della Clinica Odontoiatrica dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca presso l'ospedale

S. Gerardo di Monza. Nella maggior parte dei pazienti, il riscontro della lesione è stato di tipo occasionale (80,5%), mentre nella restante parte (19,5%) era presente una sintomatologia algica di origine flogistica che ha indotto a un approfondimento radiografico.

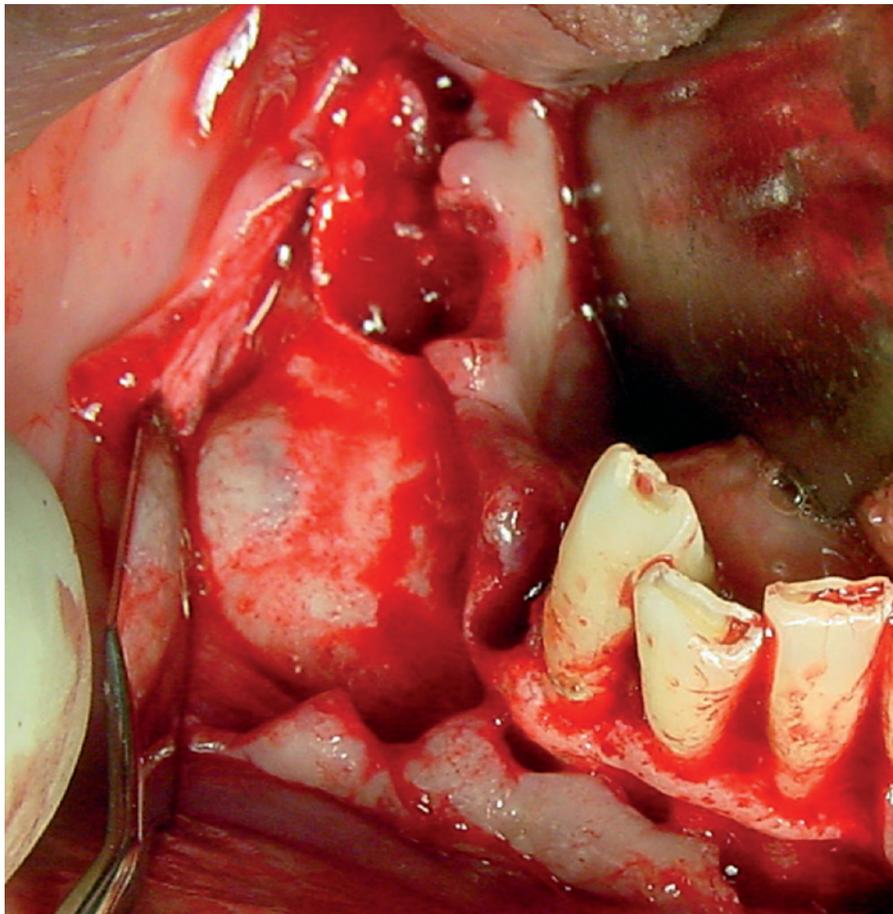
Dalla totalità dei 28 pazienti operati di cistectomia ne sono stati esclusi quattro dallo studio per non aver effettuato tutti i richiami e i controlli previsti dal protocollo (Drop-out) (tabella 1).

Tutti i pazienti sono stati operati utilizzando la stessa metodica anestesologica, che ha previsto l'anestesia generale bilanciata mediante intubazione naso-tracheale: questo al fine di ottenere un sufficiente grado di collaborazione da

**TABELLA 1 – DATI ANAGRAFICI E CLINICI DEI PAZIENTI**

Pazienti	Sesso	Etá	Localizzazione	Dimensione (cm)	Anestesia	Complicanze
1	F	72	area 4.2 – 4.3 – 4.4	3,5	generale	nessuna
2	M	67	area 1.1 – 1.2-1.3	2,8	generale	nessuna
3	F	17	area 3.1 – 3.2	1,5	generale	nessuna
4	F	55	area 2.1 – 2.2 – 2.3	2,5	generale	nessuna
5*	M	65	area 3.7 – 3.8	2,3	generale	nessuna
6	M	41	area 2.6 – 2.7	2,2	generale	nessuna
7	F	40	area 4.5 – 4.7	2,5	generale	nessuna
8*	M	45	area 1.6-1.7	1,7	generale	nessuna
9*	F	57	area 2.4 – 2.5	1,9	generale	nessuna
10	M	54	area 1.1 – 1.2	1,8	generale	nessuna
11	M	36	area 2.3 – 2.4 – 2.5	2,5	generale	nessuna
12	F	36	area 1.1 – 1.2	1,9	generale	nessuna
13	M	57	area 3.4 – 3.5	2,3	generale	nessuna
14*	F	45	area 1.3 – 1.7	3,6	generale	nessuna
15	F	28	area 2.1 – 2.3	2,6	generale	nessuna
16	F	38	area 4.3 – 4.4 – 4.5	2,8	generale	nessuna
17	M	34	area 1.2 – 1.3 – 1.4	2,5	generale	nessuna
18	F	53	area 1.7 – 1.8	2,1	generale	nessuna
19	M	54	area 3.4 – 3.6	2,7	generale	nessuna
20	M	47	area 4.6	1,5	generale	nessuna
21	M	48	area 3.3 – 3.4 – 3.5	3,4	generale	nessuna
22	M	71	area 3.3 – 4.3	4,3	generale	nessuna
23	F	37	area 3.7-3.8	1,8	generale	nessuna
24	M	54	area 2.2 – 2.3 – 2.4	3,6	generale	nessuna
25	M	38	area 1.5 – 1.8	4,1	generale	nessuna
26	F	58	area 4.4 – 4.6 – 4.7	4,2	generale	nessuna
27	M	64	area 2.3 – 2.5	3,4	generale	nessuna
28	M	13	area 2.2 – 2.3	1,5	generale	nessuna

\* pazienti usciti dallo studio per non aver effettuato tutti i controlli previsti dal protocollo



### **3. La fase di scollamento.**

parte del paziente, considerando sia la durata degli interventi sia il discomfort che la sede e l'ampiezza delle lesioni avrebbero creato ai pazienti.

Per ottenere una maggior standardizzazione, la procedura chirurgica è stata attuata dalla stessa équipe chirurgica e con il medesimo strumentario.

Il protocollo ha previsto, in fase pre-chirurgica, la raccolta dei dati anamnestici e del materiale radiografico. Nella totalità dei casi, l'indagine radiografica pre-operatoria di base è stata una ortopantomografia e in 10 casi è stata richiesta una tomografia assiale computerizzata con programma Denta-scan per valutare l'eventuale interessamento delle corticali ossee e i

rapporti con altre strutture anatomiche di rilievo.

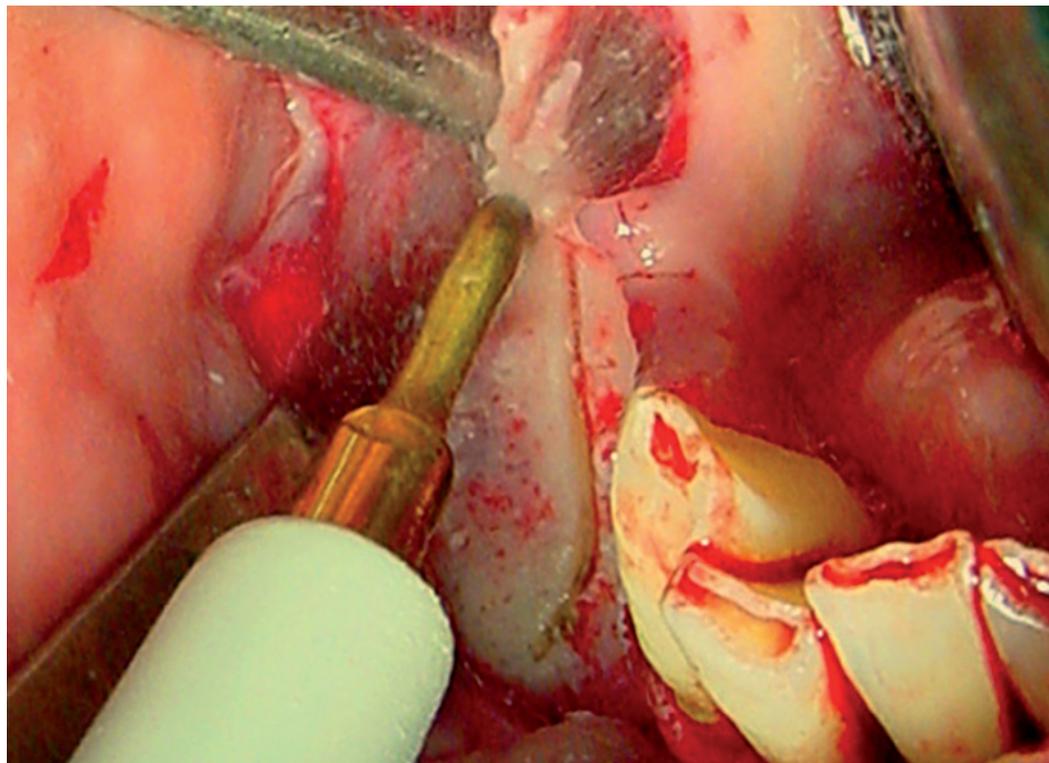
Tutti i pazienti sono stati sottoposti a copertura antibiotica pre-operatoria mediante l'utilizzo di un antibiotico ad ampio spettro (1 g di amoxicillina e acido clavulanico) somministrato almeno 1 ora prima dell'intervento da continuare poi due volte al giorno per 7 giorni al medesimo dosaggio.

È stato poi applicato un protocollo di igiene orale che ha previsto l'utilizzo di collutorio con clorexidina 0,12% da utilizzare 3 volte al giorno per 15 giorni.

### **Protocollo chirurgico**

Il protocollo chirurgico ha previsto un'incisione di un lembo mucoperiosteo trapezoidale nella totalità dei pazienti trattati. L'osteotomia, necessaria per accedere alla lesione cistica, è stata eseguita nel rispetto dei tessuti molli e delle strutture nervose.

### **4. Utilizzo del Piezosurgery per l'osteotomia.**



È stata utilizzata una tecnica minivasiva con Piezosurgery con appositi inserti avendo cura, ove le corticali fossero integre, di preservare il tessuto osseo per agevolare il riposizionamento dei tessuti molli e favorire la guarigione della cavità residua. L'enucleazione della cisti è stata effettuata con appositi strumenti e la cavità residua è stata abbondantemente detersa con lavaggi di fisiologica sterile e soluzione antibiotica (Rifocin® soluzione locale) al fine di abbattere la carica batterica.

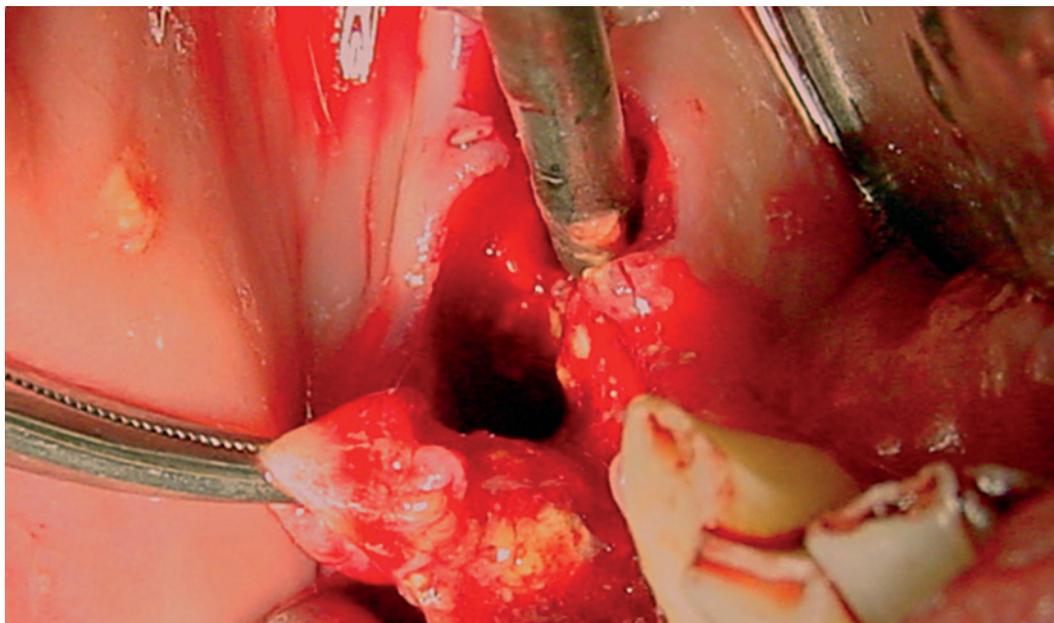
**”  
Quirynen et al., nel 1999,  
hanno eseguito uno studio  
allo all'interno delle nicchie  
ecologiche presenti nel  
cavo orale, nonché gli  
eventuali effetti sistemici  
che potevano presentarsi  
in seguito all'utilizzo di tale  
protocollo terapeutico.  
“**

Le lesioni cistiche enucleate sono state tutte fissate in formalina e inviate per l'analisi istologica al reparto di Istologia e anatomia patologica dell'ospedale S. Gerardo di Monza.

A chiusura della ferita è stata applicata una sutura in seta 3/0 (figure 3-5).

Il decorso post-operatorio è stato regolare per tutti i pazienti a esclusione del dolore post-operatorio che è stato controllato con la somministrazione di farmaci analgesici e antinfiammatori non steroidei.

Al momento della rimozione della sutura, tutti i pazienti presentavano una buona guarigione della ferita chirurgica. Non si sono verificate complicanze neurologiche permanenti.



**5. Enucleazione della lesione cistica.**

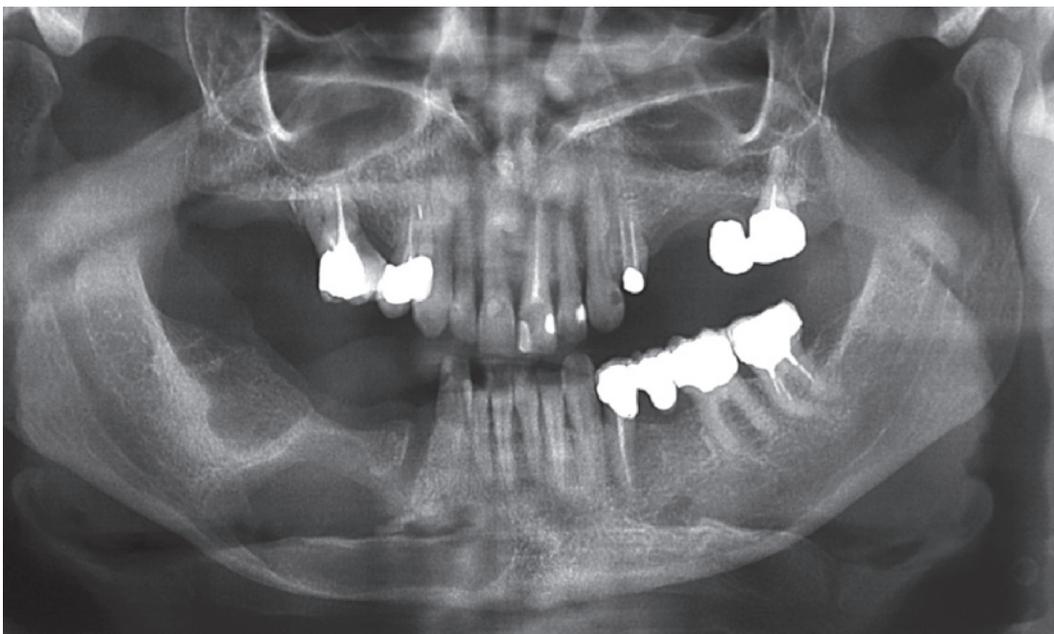
### **Follow-up**

Tutti i pazienti si sono presentati alla nostra attenzione con ortopantomografia. Dopo l'intervento di cistectomia sono state eseguite visite di controllo secondo un protocollo che prevedeva l'esecuzione di nuove radiografie e visite cliniche a distanza

di 6 (T1), 12 (T2) e 24 (T3) mesi dalla chirurgia.

### **Misurazioni effettuate**

Nei controlli clinici programmati a 6, 12 e 24 mesi sono state valutate tutte le possibili complicanze post-operatorie ponendo particolare attenzione all'assenza



**6. Ortopantomografia post-operatoria.**

di infezione, di dolore e di alterazioni neurologiche. I pazienti hanno eseguito tre radiografie di controllo dopo l'intervento di cistectomia secondo il timing programmato del follow-up. L'acquisizione delle radiografie è stata fatta attraverso una digitalizzazione per mezzo di uno scanner retroilluminato (Mustek A3IIT). Nei controlli radiografici è stata valutata la rigenerazione ossea attraverso la variazione dimensionale dell'area operata. Per le valutazioni e il calcolo delle aree cistiche è stato utilizzato un software (Adobe Photoshop CS2) che ha permesso di calcolare l'area residua dopo aver delineato il perimetro manualmente sul monitor.



**Quirynen et al., nel 1999, hanno eseguito uno studio allo all'interno delle nicchie ecologiche presenti nel cavo orale, nonché gli eventuali effetti sistemici che potevano presentarsi in seguito all'utilizzo di tale protocollo terapeutico.**



### **Caso clinico**

Nella ortopantomografia post-operatoria è possibile evidenziare l'area cistica nel quarto quadrante che si estendeva da 4.4 a 4.7. È possibile apprezzare la stretta vicinanza con il nervo alveolare inferiore (figura 6).

A 24 mesi dall'intervento si è ottenuta una rigenerazione ossea spontanea ottimale con un elevato grado di ossificazione apprezzabile nella ortopantomografia di controllo eseguita al terzo e ultimo controllo previsto dal protocollo (figura 7).

## Risultati

Le ortopantomografie sono state comparate a 6, 12 e 24 mesi.

Le aree sono state calcolate e confrontate con l'area post-operatoria. In questo modo si è ottenuta la percentuale di riduzione della cavità residua.

Nelle tabelle 2 e 3 sono raccolti tutti i valori (espressi in pixel) delle cavità residue per ogni paziente e per ogni tempo del follow-up.

Nel grafico di figura 8 sono raccolti i valori percentuali medi delle aree nei diversi tempi di rilevamento previsti dal protocollo.

È possibile notare come una riduzione significativa dimensionale delle cavità sia evidente a partire dal primo controllo eseguito 6 mesi dopo l'intervento chirurgico.

Una netta riduzione è apprezzabile dopo 24 mesi, dove nella maggior parte dei casi la cavità risulta in gran parte essere rigenerata.

L'analisi dei valori medi indica come l'area sottoposta a chirurgia si riduca dopo 6 mesi dall'intervento del 15,13%.

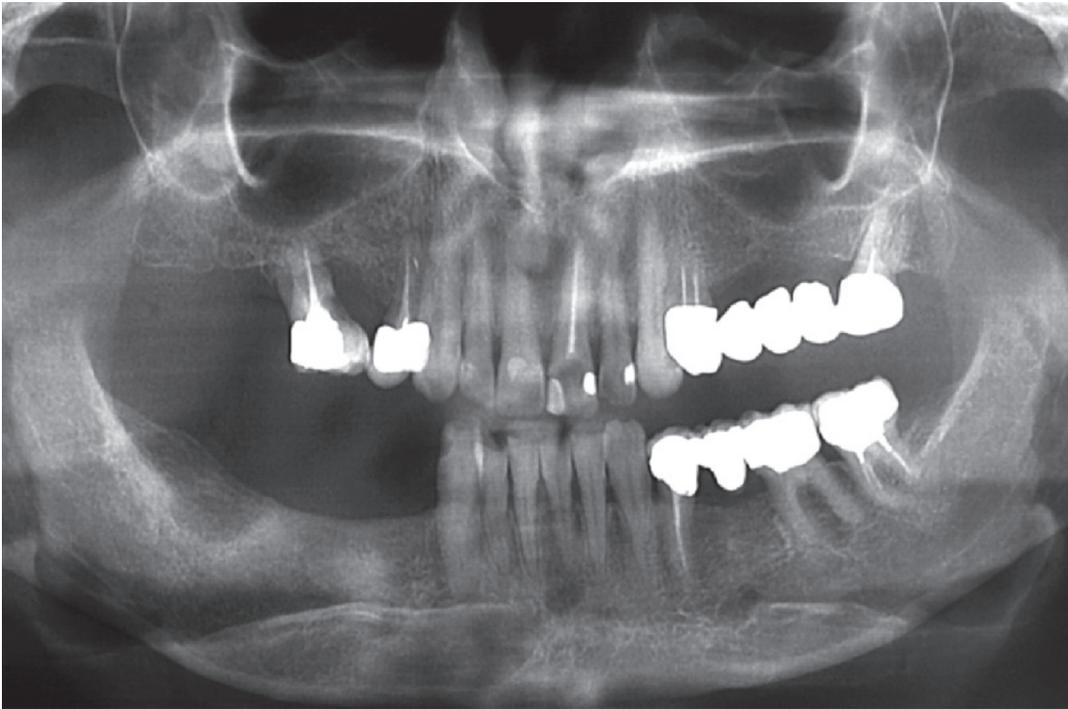
Più evidente è la riduzione a 12 mesi dall'intervento: è possibile affermare che nella maggior parte dei pazienti trattati la dimensione dell'area appare dimezzata e il valore medio conferma questo dato con una percentuale di riduzione pari al 49,48%.

Dopo 24 mesi gran parte delle cavità risultano riossificate e la riduzione dimensionale è pari all'83,73%.

## Discussione

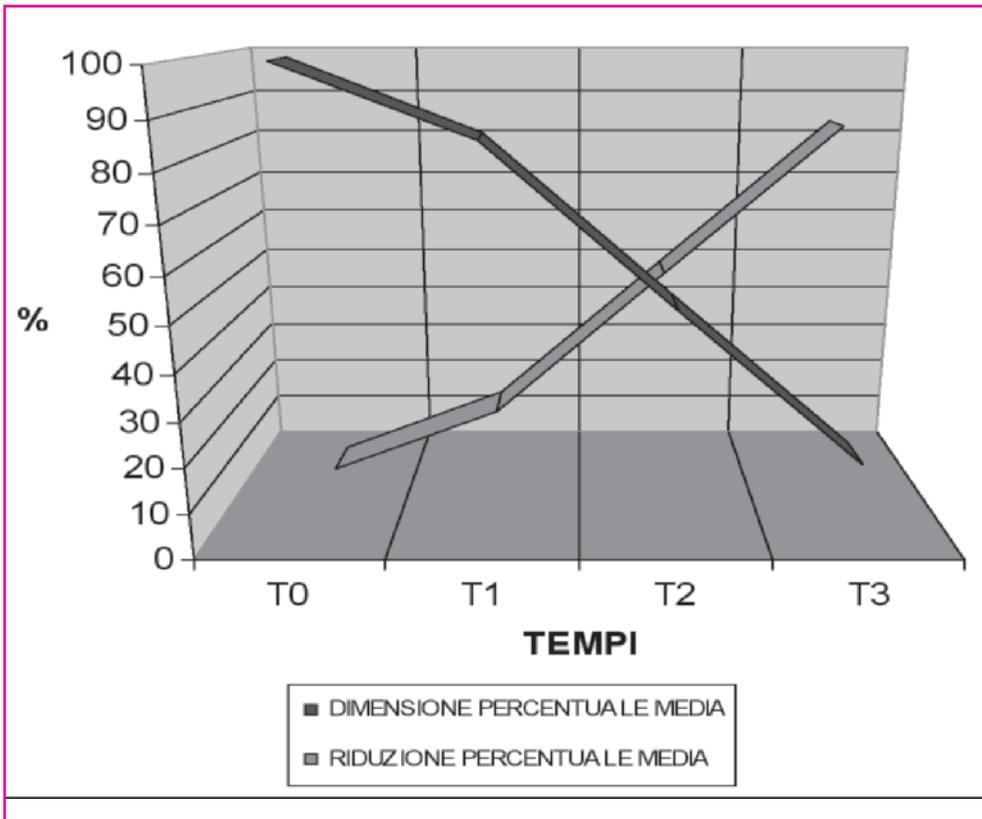
Un'analisi della letteratura dimostra come esista a tutt'oggi una discordanza di pareri sui trattamenti di lesioni cistiche delle ossa mascellari.

Diversi autori suggeriscono l'utilizzo



7. Ortopantomografia di controllo a 24 mesi dalla cistectomia.

8. Rappresentazione dei valori medi di riduzione dell'area residua.



di materiali di innesto per riempire le cavità residue dopo l'enucleazione di cisti di medie e grandi dimensioni. Il fine principale sarebbe quello di ridurre il rischio di fratture ossee<sup>8,9</sup> provocato dall'eccessivo indebolimento osseo in seguito alla chirurgia e di migliorare i processi rigenerativi.

I materiali proposti sono i più vari ma il gold standard risulta essere l'osso autologo<sup>1,10-13</sup>.

Tuttavia, la percentuale di fratture connessa a cistectomia non trova sufficiente supporto in letteratura e addirittura, secondo alcuni autori<sup>3</sup>, sarebbe prossima a zero.

Si aggiunga che l'utilizzo di biomateriali non è scevro da complicanze, quale per esempio un'aumentata frequenza di infezione e costi biologici maggiori come nel caso di osso autologo.

È noto come sia importante, in fase di guarigione, l'assenza di infezione.

Horowitz afferma che le dimensioni delle cisti non sembrano essere direttamente proporzionali alla prognosi in termini di rigenerazione ossea.

La dimensione della cisti è un parametro che ha minore rilevanza nell'insorgenza di complicanze rispetto, per esempio, al rigoroso controllo dell'asepsi e all'accuratezza della tecnica chirurgica. L'utilizzo di altri materiali riempitivi come l'idrossiapatite o l'osso eterologo aumentano invece i tempi di guarigione a causa di un rallentamento dei tempi di riassorbimento<sup>14,15</sup>.

Molti autori<sup>2-7,16-23</sup>, invece, sono concordi nel ritenere la sola rigenerazione spontanea sufficiente a una *restituito a integum* delle aree trattate.

Il fisiologico processo riparativo trasforma nel tempo il coagulo in osso neoformato che permette una spontanea rigenerazione ossea.

Come dimostrato da Chiapasco et al.<sup>3</sup>

e da Stoelinga et al.<sup>6</sup> il processo di rigenerazione nelle cavità senza innesti non implica rallentamenti artificiali nella formazione di tessuto osseo vitale e consente di raggiungere, molto frequentemente, risultati talvolta ottenibili con gli innesti in tempi simili.

**”  
Quirynen et al., nel 1999,  
hanno eseguito uno studio  
allo all’interno delle nicchie  
ecologiche presenti nel  
cavo orale, nonché gli  
eventuali effetti sistemici  
che potevano presentarsi  
in seguito all’utilizzo di tale  
protocollo terapeutico.  
“**

## Conclusioni

In relazione all’esito raggiunto dalla nostra casistica, su 24 pazienti con metodica Piezosurgery non associata a nessun riempitivo, è possibile affermare che si è ottenuta una rigenerazione ossea spontanea apprezzabile e con un livello di riossificazione elevato.

L’utilizzo di tecniche mini-invasive con l’ausilio della piezochirurgia ha permesso di minimizzare il discomfort post-operatorio del paziente, mentre la selettività d’azione del Piezosurgery® consente di rispettare strutture anatomiche importanti quali vasi e nervi, anche laddove esista un elevato rischio di lesione intra-operatoria delle stesse.

La procedura chirurgica permette di ridurre anche i rischi e le complicanze post-operatorie.

Se si considerano i risultati ottenuti dai nostri studi e le attente analisi effettuate

**TABELLA 2 – VARIAZIONI DIMENSIONALI (PIXEL) DELLE AREE RESIDUE AI DIVERSI TEMPI DEL FOLLOW-UP**

Paziente	T0	T1	T2	T3
1	39,5	33,18	19,76	4,74
2	31,58	26,53	14,98	5,69
3	18,4	15,46	10,56	2,76
4	29,15	24,78	15,57	5,76
5	27,2	23,26	12,43	4,34
6	28,89	23,98	14,32	5,02
7	21,63	18,61	10,95	3,44
8	29,92	24,84	14,36	5,12
9	22,25	18,69	10,94	3,89
10	27,91	24,01	14,04	4,08
11	29,45	25,63	14,78	4,78
12	30,63	25,73	16,78	6,75
13	29,02	24,09	13,69	5,55
14	26,7	22,97	13,96	3,99
15	30,12	25,91	16,83	5,98
16	17,35	14,93	8,77	3,23
17	39,42	34,3	18,79	6,31
18	49,38	42,47	25,96	6,92
19	21,84	19,22	10,56	3,72
20	42,26	35,08	20,55	7,26
21	47,89	39,78	24,59	7,19
22	48,13	41,4	24,65	7,71
23	39,04	32,8	18,76	4,54
24	17,41	14,63	9,83	2,45

**TABELLA 3 – VALORI MEDI DELLE DIMENSIONI DELLE AREE RESIDUE E CALCOLO DELLA RIDUZIONE PERCENTUALE RISPETTO ALLE RADIOGRAFIE POST-OPERATORIE**

	T0	T1	T2	T3
Media	31,04	26,35	15,68	5,05
Percentuale	100	84,90	50,52	16,27
Riduzione %	0	15,13	49,48	83,73

sui nostri pazienti possiamo constatare che i processi riparativi e rigenerativi sono avvenuti in tempi piuttosto rapidi e hanno permesso una *restituito a integrum* delle aree trattate senza l'utilizzo di materiali da innesto.

## bibliografia

1. Horowitz I, Bodner L. Use of xenograft bone with aspirated marrow for treatment of cystic defect of the jaws. *Head & Neck* 1989;11:516-523.
2. Santamaria J, Garcia AM, De Vincente JC, Landa S, Lopez-Arranz JS. Bone regeneration after radical cyst removal with and without guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27(2):118-20.
3. Chiapasco M, Rossi A, Motta JJ, Crescentini M. Spontaneous bone regeneration after enucleation of large mandibular cysts: a radiographic computer analysis of 27 consecutive cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58(9):942-8.
4. Chiapasco M. *Manuale illustrato di chirurgia orale*. Milano: Masson, 2002.
5. Stoelinga PJW, Bronkhorst FB. The incidence, multiple presentation and recurrence of aggressive cyst of jaws. *J Cranio Maxillofac Surg* 1987;15:184-195.
6. Stoelinga PJW. Long-term follow-up on keratocysts treated according to a defined protocol. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001;30:14-25.
7. Pippi R, Vitolo D. A clinical radiographic and histologic reevaluation of a 10 years sample of surgically treated cysts of the jaws, with special emphasis on keratocysts. *Min Stomatol* 2004;53(5):251-61.
8. Richter M, Laurent F, Chausse JM. Homologous cancellous bone graft for large jaw defects caused by bone cysts. *J Oral Maxillofac Surg* 1986;44(6):447-53.
9. Ciani A, Mangano C, Donzelli R, Bucci Sabattini V. Cisti radicolare della mandibola. *Dental Cadmos* 1992;19:74-79.
10. Marx RE. Clinical application of bone Biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clin Plast Surg* 1994;3:377-392.
11. Marx RE, Kline SN, Johnson RP, Malinin TI et al. The use of freeze-dried allogenic bone in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Surg* 1981;39:264-274.
12. Salmassy DA, Pogrel MA. Liquid nitrogen cryosurgery and immediate bone grafting in the management of aggressive primary jaw lesions. *J Oral Maxillofac Surg* 1995;53:784-790.

### Corrispondenza

dott. Fabrizio Carini

Università degli Studi di Milano-Bicocca,  
Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche,  
Clinica Odontoiatrica, Reparto di Chirurgia Orale,  
Azienda Ospedaliera San Gerardo,  
via Pergolesi, 33 – 20052 Monza (MI)  
e-mail: f.carini@hsgerardo.org

13. Kiyokawa K, Kiyokawa M, Tai Y, Tanaka S. New regenerative surgical treatment of cystic diseases of the jaw by utilizing grafting of cancellous iliac bone and replanting of patient's teeth. *J Craniofacial Surg* 2004;15(5):792-796.

14. Smiler DG, Johnson PW, Lozada JL, Misch C, Rosenlich JL, Tatum OH, Wagner JR. Sinus lift graft and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am* 1992;36(1):151-186.

15. Moy PK, Lundgren S, Holmes RE. Maxillary sinus augmentation: histomorphometric analysis of graft materials for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 1993;51(8):857-862.

16. Moskow B, Gold, Gottsegen R. Effects of scleral collagen upon the healing of experimental osseous wounds. *J Oral Maxillofac Surg* 1976;47:596-602.

17. Voorsmit X, Stoelinga PJW, Van Haelst X. The management of keratocyst. *J Maxillofacial Surg* 1981 Nov; fascicolo: pagine.

18. Mitchell R. An evaluation of bone healing in cavities in the jaws implanted with a collagen matrix. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1992;30:180-182.

19. Meiselman F. Surgical management of the odontogenic keratocyst: conservative approach. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52:960-963.

20. Kawai T, Murakami S, Hiranuma H, Sakuda M. Healing after removal of benign cysts and tumors of the jaws. A radiologic appraisal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995;79:517-525.

21. Abdulwassie H, Dhanrajani PJ. Prosthodontic implant rehabilitation after the treatment of a patologic lesion in the mandible: a case report. *Implant Dent* 2001;10(3):178-81.

22. Bodner L. Effect of decalcified freeze-dried bone allograft on the healing of jaw defects after cyst enucleation. *J Oral Maxillofac Surg* 1996;54:1282-1286.

23. Bodner L, Bar-Ziv J. Characteristics of bone formation following marsupialization of jaw cysts. *Dentomaxillofac Radiology* 1998;27:166-171.