

ایمونوفنوتایپ اطفال مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستیک، مراجعه کننده به بیمارستان شهید صدوقی یزد

دکتر اعظم السادات هاشمی*^۱، دکتر محمد علی منوچهری نائینی^۲، دکتر ضیاء اسلامی^۳، دکتر محمد حسن لطفی^۴، دکتر مریم خیراندیش^۵ مهدی رفیعیان^۶

چکیده

مقدمه: ایمونوفنوتایپ یکی از فاکتورهای دخیل در تعیین نوع و شدت درمان، در بیماران مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستیک است. هدف از این تحقیق تعیین توزیع فراوانی فنوتایپ‌های لوسمی حاد لنفوبلاستیک براساس فلوسیتومتری در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان شهید صدوقی یزد بود.

روش بررسی: این تحقیق از نوع مشاهده‌ای - توصیفی بوده و به روش گزارش موارد (Case Series) انجام گردید. جامعه مورد بررسی اطفال مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستیک ۱۴-۰ سال مراجعه کننده به بیمارستان شهید صدوقی یزد بودند. نمونه مغز استخوان ۵۶ بیمار جهت تعیین CD Marker ها به مرکز فلوسیتومتری سازمان انتقال خون یزد فرستاده شد و سپس با توجه به حداکثر درصد CD Marker ها، گروه وزیرگروه سلول لوسمیک مشخص گردید و رابطه بین فاکتورهای پروگنوستیک با نوع سلول لوسمیک (T-cell, B-cell) با استفاده از تست آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: بر اساس فلوسیتومتری ۳۱ بیمار (۵۹/۶٪) ایمونوفنوتایپ T-cell و ۲۱ بیمار (۴۰/۴٪) ایمونوفنوتایپ B-cell داشتند. در این بررسی اگرچه فراوانی عوامل پروگنوستیک نامطلوب در گروه T-cell بیشتر از گروه B-cell بودند ولی تفاوت معنی داری به جز در مورد جنس مذکر وجود نداشت (P: ۰/۰۲).

نتیجه گیری: فراوانی نسبی T-Cell در جامعه مورد بررسی ما بالاتر از سایر مناطق جهان می باشد که علت این امر شاید به سبب عوامل محیطی از جمله مواد سرطان‌زا باشد. از طرفی تفاوت معنی داری در پیامد بیماری (عود و مرگ) بین دو گروه T-Cell و B-Cell وجود نداشت که علت آن می تواند انتخاب نوع شیمی درمانی براساس فاکتورهای خطر باشد.

واژه‌های کلیدی: فلوسیتومتری، CD Marker، لوسمی حاد لنفوبلاستیک، ایمونوفنوتایپ

مقدمه

لوسمی حاد شایع ترین سرطان اطفال بوده و تقریباً ۳۰ درصد از

* ۱- نویسنده مسئول: استادیار گروه اطفال - فوق تخصص هماتولوژی اطفال مرکز تحقیقات خون و سرطان استان یزد
تلفن: ۰۳۵۱-۸۲۲۴۰۰۱ ؛ نامبر: ۰۳۵۱-۸۲۲۴۱۰۰

Email: dr_a_hashemi@yahoo-com

۲- متخصص گروه اطفال

۳- استادیار گروه اطفال

۴- استادیار گروه آمار و اپیدمیولوژی - دانشکده بهداشت

۵- پزشک عمومی

۶- دانشجوی پزشکی

۱- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۲/۱۹

بدخیمی‌های آنها را شامل می‌شود. از این میان لوسمی حاد لنفوبلاستیک (ALL)، حدود ۷۵٪ موارد را به خود اختصاص می‌دهد (۱). براساس فاکتورهای خطر، بیماران به دو گروه پرخطر و کم خطر تقسیم شده و نوع درمان براین اساس تنظیم می‌گردد. این شیوه درمانی، سبب بهبود بقا در لوسمی حاد لنفوبلاستیک در ۲۰ سال اخیر شده است. این فاکتورهای پروگنوستیک عبارتند از: تعداد گلبولهای سفید، سن بیمار در زمان تشخیص بیماری، یافته‌های سیتوژنیک، پاسخ اولیه به درمان و ایمونوفنوتایپ بیماران (۲).

بیماران مبتلا به دو گروه B-cell و T-cell و ۶ زیر گروه (Pro B-cell, Mature Intermediate T-cell, Immature T-cell) T-cell، Pre B-cell و Mature B-cell) تقسیم گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری: اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS، تست های آماری کای اسکوار و آزمون دقیق فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در این بررسی P-value های کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردیدند.

نتایج

در این مطالعه ۵۶ مورد کودک مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستیک (۱۴-۰ سال) مورد بررسی قرار گرفتند. از این میان فلوسیتومتری ۵۲ بیمار در دسترس بود (۴ مورد به دلیل عدم دسترسی به فلوسیتومتری از مطالعه خارج شدند). بیماران ۳۴ نفر (۶۰/۷٪) مذکر و ۲۲ نفر (۳۹/۳٪) مؤنث بودند. از نظر سنی بیماران به سه گروه سنی، زیر یک سال ۲ نفر (۳/۶٪)، ۱ تا ۱۰ سال ۴۲ نفر (۷۵٪) و بالای ۱۰ سال ۱۲ نفر (۲۱/۴٪) تقسیم شدند.

توزیع فراوانی نسبی یافته‌های بالینی و پاراکلینیکی به ترتیب در جداول ۱ و ۲، توزیع فراوانی زیر گروه لوسمی حاد لنفوبلاستیک براساس فلوسیتومتری در جدول ۳ و توزیع فراوانی عوامل مؤثر بر پیش‌آگهی نامطلوب برحسب نوع سلول لوسمی حاد لنفوبلاستیک در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۱: نشان دهنده توزیع فراوانی یافته‌های بالینی در بیماران مورد مطالعه است ۳۵/۷ درصد بیماران اسپلینومگالی، ۳۳/۹ درصد هپاتومگالی، ۲۵ درصد آدنوپاتی و ۵/۴ درصد درگیری CNS داشتند.

پیامد بیماری از نظر عود و مرگ در بیماران مورد مطالعه با ایمونوفنوتایپ B-cell All به ترتیب (۱۳/۶٪) و (۳(۱۳/۶٪) بود در حالی که در بیماران با ایمونوفنوتایپ T-cell All میزان عود و مرگ به ترتیب برابر با (۲۶/۷٪) و (۱۰٪) بود که با بکارگیری آزمون آماری کای اسکوار ارتباط معنی دار آماری بین پیامد بیماری و نوع سلول لوسمی وجود نداشت.

جدول ۲: نشانگر توزیع فراوانی طبقات مختلف متغیرهای آزمایشگاهی در بیماران مورد مطالعه است. همانگونه که مشاهده

سلولهای لوسمیک براساس مرحله‌ای که در آن دچار توقف (Arrest) می‌شوند آنتی‌ژنهای مخصوصی را در سطح سلول و داخل سیتوپلاسم خود ظاهر می‌سازند که به وسیله اضافه کردن مونوکلونال آنتی‌بادیها قادر به شناسایی این آنتی‌ژنها به وسیله دستگاه فلوسیتومتری هستیم. به این آنتی‌ژنها اصطلاحاً CD Marker اطلاق می‌شود و براین اساس بیماران به دو گروه B-cell, T-cell و ۶ زیر گروه تقسیم می‌گردند (۳).

ایمونوفنوتایپ در تعیین شدت درمان در بیماران لوسمی حاد لنفوبلاستیک دخیل است و از توزیع فراوانی انواع ایمونوفنوتایپ لوسمی حاد لنفوبلاستیک در منطقه اطلاعی در دسترس نیست. هدف از این پژوهش، بررسی توزیع فراوانی فنوتایپ‌های لوسمی حاد لنفوبلاستیک براساس فلوسیتومتری و تعیین ارتباط نوع سلول لوسمیک با عوامل پروگنوستیک و پیامد بیماری (مرگ و عود) است.

روش بررسی

این تحقیق از نوع توصیفی-تحلیلی می‌باشد. جامعه مورد بررسی در این مطالعه، تمامی کودکان مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستیک (۱۴-۰ سال) که در طی چهار سال به بیمارستان شهید صدوقی یزد مراجعه کرده بودند را شامل می‌شد.

اطلاعات بیماران مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستیک همچون سن، جنس، زمان تشخیص، یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی در هنگام تشخیص بیماری در پرسشنامه وارد شد. در این مطالعه، بیماران مشکوک به لوسمی (براساس علایم بالینی و آزمایشگاهی) جهت تشخیص بیماری تحت آسپیراسیون مغز استخوان قرار گرفته و لامهای تهیه شده از نمونه آسپیراسیون توسط هماتولوژیست و پاتولوژیست مورد ارزیابی قرار گرفت و به طور همزمان نمونه‌ای از آسپیراسیون مغز استخوان جهت تعیین CD Marker ها به مرکز فلوسیتومتری سازمان انتقال خون یزد فرستاده شد و با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر (PAS III (http://www.partec.de)، درصد CD Markerهای مختلف-CD34, CD33, CD13, HLA-DR, CD3, CD2, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20 روی نمونه مشخص گردید و سپس با توجه به حداکثر درصد CD Markerها، گروه و زیرگروه سلول لوسمیک مشخص شد به طوری که

جدول ۳: توزیع فراوانی نسبی ساب تایپ‌های لوسمی حاد لنفوبلاستیک بر اساس نتایج به دست آمده از فلوسیتومتری

ساب تایپ	فراوانی درصد	درصد
Immature Tcell	۵	۷/۷٪
Intermediate Tcell	۲	۵/۸٪
Mature Tcell	۲۴	۴۶/۲٪
Pro B cell	۶	۱۱/۵٪
Pre B cell	۱۱	۱۲/۲٪
Mature B cell	۴	۷/۷٪
جمع	۵۲	۱۰۰٪

جدول ۴: توزیع فراوانی عوامل پروگنوستیک نامطلوب در کودکان ۱-۱۴ ساله بر حسب نوع سلول لوسمی حاد لنفوبلاستیک بر اساس فلوسیتومتری

عامل نوع سلول	B سل	T سل	P
پروگنوستیک نامطلوب			
سن کمتر از یکسال یا بیش از ۱۰ سال	۶٪ (۴۰)	۹٪ (۶۰)	0.05
جنسیت مذکر	۱۰٪ (۳۰/۳)	۲۳٪ (۶۹/۷)	0.02
هپاتومگالی	۷٪ (۳۱/۸)	۱۱٪ (۳۶/۷)	0.07
آدنوپاتی	۵٪ (۲۲/۷)	۸٪ (۲۶/۷)	0.08
اسپنومگالی	۵٪ (۲۲/۷)	۱۴٪ (۴۶/۷)	0.07
درگیری CNS	۰٪ (۰)	۳٪ (۱۰)	0.06
WBC مساوی یا بیشتر از ۵۰۰۰۰	۲٪ (۹/۱)	۹٪ (۳۰)	0.03
Hg مساوی یا بالاتر از ۱۰	۶٪ (۲۷/۳)	۸٪ (۲۶/۸)	0.06
پلاکت کمتر از ۱۰۰۰۰۰	۷٪ (۳۱/۸)	۸٪ (۲۶/۸)	0.09
LDH	۱۴٪ (۶۳/۶)	۱۵٪ (۵۰)	0.06

بحث

مطالعه حاضر شامل بررسی فلوسیتومتری ۵۲ بیمار مبتلا به ALL مراجعه کننده به بیمارستان شهید صدوقی یزد می‌باشد. از این تعداد ۳۳ نفر مذکر شامل ۲۳ نفر با ایمونوفنوتایپ T-cell و ۱۰ نفر با ایمونوفنوتایپ B-cell و ۱۹ نفر مؤنث شامل ۷ نفر با ایمونوفنوتایپ T-cell و ۱۲ نفر با ایمونوفنوتایپ B-cell بودند. به طوری که نسبت مرد به زن ۱/۷۳ بود. از نظر سنی ۲ بیمار (۳/۶٪) سن کمتر یا مساوی ۱ سال، ۴۲ بیمار (۷۵٪) سن ۱ تا ۱۰ سال و ۱۲ بیمار (۲۱/۴٪) سن بیشتر یا مساوی ده سال داشتند. بر اساس فلوسیتومتری ۲۱ بیمار (۴۰/۴٪)، ایمونوفنوتایپ B-cell و ۳۱ بیمار (۵۹/۶٪) ایمونوفنوتایپ T-cell داشتند. توزیع فراوانی زیر رده‌های لوسمی حاد لنفوبلاستیک اطفال بر اساس فلوسیتومتری

می‌شود ۱۹/۶٪ بیماران مبتلا به ALL، WBC بالای ۵۰۰۰۰، ۷۱/۴٪ پلاکت کمتر از ۱۰۰۰۰۰، ۲۶/۸٪ هموگلوبین بیشتر یا مساوی ۱۰ و ۵۷/۱٪ بیماران، LDH بیشتر یا مساوی ۸۰۰ داشتند.

همانگونه که در جدول ۳ دیده می‌شود بیشترین فراوانی مربوط به ساب تایپ Mature Tcell (۴۶/۲٪) بود.

طبق جدول ۴: فراوانی نسبی عوامل پروگنوستیک نامطلوب (سن کمتر از یک سال و یا بیش از ۱۰ سال، جنسیت مذکر، هپاتومگالی، اسپنومگالی، درگیری CNS، $WBC \geq 50000$ در گروه T سل بیشتر از گروه B سل می‌باشد ولی تنها تفاوت معنادار در جنسیت مذکر می‌باشد.

جدول ۱: توزیع فراوانی نسبی یافته‌های بالینی در بیماران با لوسمی حاد لنفوبلاستیک اطفال

یافته‌ها بالینی	فراوانی درصد	درصد
اسپنومگالی	۲۰	۳۵/۷٪
ندارد	۳۶	۶۴/۳٪
هپاتومگالی	۱۹	۳۳/۹٪
ندارد	۳۷	۶۶/۱٪
آدنوپاتی	۱۴	۲۵٪
ندارد	۴۲	۷۵٪
توده مدیاستن	۲	۳/۶٪
ندارد	۵۴	۹۶/۴٪
گرفتاری CNS	۳	۵/۴٪
ندارد	۵۳	۹۴/۶٪
جمع	۵۶	۱۰۰٪

جدول ۲: توزیع فراوانی نسبی اندکس‌های آزمایشگاهی در بیماران با لوسمی لنفوبلاستیک حاد اطفال

اندکس‌های آزمایشگاهی	فراوانی درصد	درصد
WBC کمتر از ۵۰۰۰۰	۴۵	۸۰/۴٪
مساوی یا بیشتر از ۵۰۰۰۰	۱۱	۱۹/۶٪
PLT کمتر از ۱۰۰۰۰۰	۴۰	۷۱/۴٪
مساوی یا بیشتر از ۱۰۰۰۰۰	۱۶	۲۸/۶٪
Hg کمتر از ۱۰	۴۱	۷۳/۲٪
مساوی یا بیشتر از ۱۰	۱۵	۲۶/۸٪
LDH کمتر از ۸۰۰	۲۴	۴۲/۹٪
مساوی یا بیشتر از ۸۰۰	۳۲	۵۷/۱٪
جمع	۵۶	۱۰۰٪

در جدول ۳ آورده شده است.

توزیع فراوانی زیررده‌های لوسمی حاد لنفوبلاستیک براساس فلوسیتومتری در مطالعات مشابه در جدول ۵ آورده شده است. فراوانی نسبی T-cell All در تایلند (۴/۱۸/۴) (۴)، بلغارستان (۲۸/۵) (۵)، مالزی (۲۲/۶) (۶) هلند (۹/۷) (۷)، عمان (۷/۸) (۸) و مکزیک (۹/۴) (۹) می‌باشد. در مطالعه‌ای که در تبریز انجام شد H1 با فلوسیتومتری مقایسه شده، مقدار متوسط درصد بلاست‌های به دست آمده در H1 برای لوسمی‌های حاد لنفوییدی B و حاد لنفوییدی T و میلویدی حاد از جمله میلویدی مزمن در فاز بلاستیک به ترتیب ۱۶/۳ درصد و ۲۷ درصد و ۶۹/۶ درصد بود. مقادیر متوسط در فلوسیتومتری به ترتیب ۶۶/۶ و ۷۹/۷ و ۸۷ درصد به دست آمد. هیچکدام از سیستم‌های یاد شده برای CLL بلاست نشان ندادند (۱۰) در حالی که در مطالعه حاضر همانطور که در بالا اشاره شد فراوانی نسبی T-cell در جامعه مورد بررسی (۵۹/۶٪) بود که این مقدار خیلی بالاتر از سایر مناطق جهان می‌باشد که علت این امر شاید به سبب تأثیر عوامل محیطی از جمله مواد سرطان‌زا محیط و مواد سرطان‌زا باشد این مسئله توسط Ramot و

همکاران مورد تأکید قرار گرفته است. که انسیدانس بالای T-cell در کشورهای صنعتی را احتمالاً، تماس با مواد سرطان‌زای محیطی دانسته است (۱۱).

در این مطالعه فراوانی نسبی عوامل پروگنوستیک نامطلوب مثل سن کمتر از یک سال و بیشتر از ۱۰ سال، جنسیت مذکر، اسپلنو مگالی، هپاتومگالی، $WBC \geq 50000$ ، و درگیری CNS در گروه T-cell بیشتر از گروه B-cell بودند ولی تنها تفاوت معنی‌دار در جنس مذکر بود (P:0.02) که این موضوع با نتایج سایر مطالعات در مورد ارتباط T-cell All با جنس مذکر، همخوانی دارد (۱۲، ۱۳).

مطالعه ما تفاوت معنی‌داری را بین پیامد بیماری (مرگ و عود) و نوع سلول لوسمیک نشان نداد که علت آن می‌تواند مربوط به نوع درمان اتخاذ شده براساس فاکتورهای خطر در گروه T-cell باشد و این موضوع با نتایج مطالعات مشابه نیز همخوانی دارد. که در این مطالعات بیان گردیده، که T-cell ALL سرانجام بدتری نسبت به B-cell, Progenitor دارد. اما چنانچه تحت شیمی درمانی قوی و شدید قرار گیرند تفاوتی در پروگنوز آنها وجود نخواهد داشت (۱۴، ۱۵).

جدول ۵: توزیع فراوانی ساب تایپ‌های لوسمی حاد لنفوبلاستیک براساس فلوسیتومتری در مطالعات سایر مناطق جهان

سال	کشور	Pro B-cell	Early pre B-cell	Pre B-cell	Transitro nal B-cell	Mature B-cell	T-cell
۱۹۹۳	Pui و همکاران	۵-۱۰٪	۵۵-۶۵٪	۲۰-۲۵٪	۲-۳٪	۲-۳٪	۱۳-۱۵٪
۱۹۹۹	Tiensiwakul و همکاران	۶۵/۸٪				۱۵/۸٪	۱۸/۴٪
۱۹۹۵	Taskov و همکاران	۱۳٪	۴۲٪	۱۱٪		۱۱٪	۲۸٪
۱۹۹۹	Nieto و همکاران	۷/۵٪	۷۴/۶٪			۳/۵٪	۹/۴٪
۲۰۰۳	Leonard و همکاران	۵/۱٪	۷۱/۲٪	۱۲/۸٪		۷٪	۷٪
۲۰۰۴	Zapolska	۶٪	۷۹/۳٪			۱/۳٪	۱۳/۴٪

نتیجه‌گیری

در جامعه مورد مطالعه ما ایمونوفنوتایپ T-cell دارای بیشترین توزیع فراوانی بود و اگرچه شیوع بیشتر عوامل پروگنوستیک همراه با T-cell All مثل جنسیت مذکر، سطح گلبول سفید بالاتر و غیره، سبب سرانجام بدتر این بیماران می‌شود ولی انجام شیمی درمانی براساس فاکتورهای خطر می‌تواند با کاهش تأثیر این عوامل همراه و پیامد را بهبود بخشد.

از طرفی ایمونوفنوتایپ T-cell در جامعه ما از فراوانی نسبی بیشتری نسبت به سایر جوامع برخوردار است و چون سایر مطالعات نقش عوامل سرطان‌زای محیطی را در ایجاد T-cell دخیل دانسته‌اند، لذا اقدام در جهت کشف و حذف این عوامل محیطی احتمالی پیشنهاد می‌شود.

References

- 1- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. *Cancer statistics*. CA-cancer J clin 2007; 57(1); 43-66.
- 2- Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, Rivera GK, Ribeiro RC, et al: *Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia*. Blood 2004; 104 (9) :2690-6.
- 3- Pui CH, Behm FG, Crist WM: *Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood 1993 ; 82(2):576-80
- 4- Tiensiwakul P, Iertlum T, Nuchprayoon I, Sexsarn P: *Immunophenotyping of acute lymphoblastic leukemia in pediatric patients by three-color flow cytometry analysis*. Asian pac J allergy immunol 1999 Mar; 17(1):17-21.
- 5- Taskov H, Dimitrova E, Serbinova M, Mendisova L, Bobev D: *Immunological subtype of childhood acute lymphoblastic leukemia in Bulgaria*. Department of immunology. Leuk Res 1995 Nov; 19 (11): 877-81.
- 6- Menon BS, Dasgupta A, Jackson N: *Immunophenotyping pediatric leukemias in Kelantan Malaysia*. Pediatric Hematol oncol 1998 mar-Apr 15(2): 175– 8.
- 7- Zapolska B, Krawczuk-Rybak M, Luczynski W, Zak J, Leszczynska E. *Immunophenotype of lymphoblastic leukemia in children in relation to clinical symptoms and laboratory tests, preceding its diagnosis*. Med wieku Rozwoj 2004 oct; 8(4pt2): 1071-80.
- 8- Brown LC, Knox-Macaulay HH. *Analysis of the immunophenotypes of de Novo acute lymphoblastic leukemia (All) in the sultanate of Oman*. Leuk Res 2003; 27(7): 649-54 .
- 9- Nieto-Martinez S, del-Campo Martinez A: *Immunophenotyping of acute lymphoblastic leukemia in Mexican children*. sangre 1999 Jun; 44(3): 188-94.
- ۱۰- سیدهادی ملجایی، جلیل واعظ. *سلول های بلاست در خون بیماران مبتلا به لوسمی های حاد: مطالعه مقایسه ای در سیستم HI و فلوسیتومتری و مروری بر عملکرد دو سیستم*. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز زمستان ۱۳۸۵؛ ۲۸(۴): ۱۱۳-۱۰۹.
- 11- Ramot B, Margrath I. *Hypothesis : the environment is a major determinant of the immunological subtype of lymphoma and acute lymphoblastic leukemia in children*. Br J Haematol 1982; 50(2): 183-9.
- 12- Uckun FM, Sensel MG, Sun L, Steinherz PG, Trigg ME, Heerema NA, et al: *Biology and Treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia*. Blood 1998; 91(3):735-746.
- 13- Hann IM, Richards SM, Eden OB, Hill FG: *Analysis of the immunophenotype of children treated on the Medical Research council united kingdom acute lymphoblastic leukemia trial XI*. Leukemia 1998; 12(8):1249-55.
- 14- Advani S, Pai S, Venzon D, Adde M, Kurkure PK, Nair CN, et al. *Acute lymphoblastic leukemia in India: an analysis of prognostic factors using a single treatment regimen*. Ann oncol 1999 feb; 10 (2):167-76.
- 15- Chen BW, Lin DT, Chuu WM, SUS, Lin KS. *An analysis of risk factor and survival in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Zhonghua 1989 sep; 30 (5): 299-308.