

NGHIÊN CỨU GIÁ TRỊ CỦA CỘNG HƯỞNG TỪ KHUẾCH TÁN TRONG CHẨN ĐOÁN UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT

Trần Thị Thùy Linh¹, Nguyễn Minh Hải¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá giá trị của cộng hưởng từ (CHT) khuếch tán trong chẩn đoán ung thư tuyến tiền liệt (UTTTL). **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang, tiến cứu kết hợp với hồi cứu trên 56 bệnh nhân (BN) đến khám tại Bệnh viện K3 từ 01/2020 - 12/2020, nghi ngờ UTTTL, được chỉ định chụp CHT khuếch tán tuyến tiền liệt (TTL), sau đó được chẩn đoán xác định bằng sinh thiết dưới hướng dẫn của siêu âm qua đường trực tràng hoặc giải phẫu bệnh sau phẫu thuật cắt toàn bộ tuyến. **Kết quả:** Tuổi của BN nghiên cứu từ 50 - 90 tuổi (trung bình 68,68). Có 20 BN có kết quả giải phẫu bệnh là ung thư (35,71%), 36 BN có kết quả giải phẫu bệnh không ung thư (64,29%). Giá trị minADC của tổn thương ung thư ($1009,89 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$) thấp hơn có ý nghĩa so với tổn thương không ung thư ($590,75 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$) với $p < 0,05$. Với ngưỡng giá trị minADC là $700 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, các tổn thương có giá trị cao hơn giá trị này có khả năng ung thư thấp hơn, với độ nhạy là 85%, độ đặc hiệu là 94,44%, giá trị dự báo dương tính 89,47%, giá trị dự báo âm tính 91,89%, độ chính xác 91,07%. CHT khuếch tán chẩn đoán UTTTL có độ nhạy là 100%, độ đặc hiệu là 80,56%, giá trị dự báo dương tính là 74,07%, giá trị dự đoán âm tính là 100%. **Kết luận:** CHT khuếch tán là phương pháp có giá trị cao trong chẩn đoán UTTTL.

* Từ khóa: Ung thư tuyến tiền liệt; Cộng hưởng từ khuếch tán; Hệ số khuếch tán biểu kiến (ADC).

Value of Diffusion Weighted Imaging in the Detection of Prostate Cancer

Summary

Objectives: To determine the value of DWI in the diagnosis of prostate carcinoma. **Subjects and methods:** A cross-sectional, prospective, and retrospective descriptive study in 56 patients who visited K3 hospital during the period of 01/2020 - 12/2020 with suspicion of prostate cancer were assigned to take diffusion weight imaging and then were diagnosed with prostate cancer by TRUS guided biopsy or pathology after total gland surgery. **Results:** Patients' age ranged from 50 to 90 years (mean 68.68 ± 9.57 years). Twenty patients were confirmed to have prostate carcinoma (Pca) (35.71%), whereas 36 prostate non-carcinoma (PNCa) (64.29%). The mean of minADC values for Pca and PNCa were $590.75 \times 10^6 \text{ mm}^2/\text{s}$ and $1009.89 \times 10^6 \text{ mm}^2/\text{s}$, respectively. The mean of minADC value of Pca was significantly lower than that of PNCa ($p < 0.05$).

¹Học viện Quân y

Người phản hồi: Nguyễn Minh Hải (nmhaidr@gmail.com)

Ngày nhận bài: 20/5/2021

Ngày bài báo được đăng: 02/7/2021

The ADC threshold of $700 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ with a sensitivity of 85%, specificity of 94.44%, the positive predictive value of 89.47%, the negative predictive value of 91.89%, and ACC of 91.07%. The DWI in the diagnosis of Pca provided a sensitivity of 100%, specificity of 80.56%, a positive predictive value of 74.07%, and a negative predictive value of 100%. **Conclusion:** DWI is a valuable method in the diagnosis of Pca with high accuracy.

* *Keywords:* Prostate carcinoma; Prostate non-carcinoma; Diffusion-weighted imaging; Apparent diffusion coefficient (ADC); Transrectal ultrasound (TRUS).

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư tuyến tiền liệt là một trong những bệnh lý ác tính phổ biến ở nam giới. Theo GLOBOCAN 2020, mỗi năm ước tính thế giới có khoảng 1.414.259 ca mắc mới, chiếm khoảng 7,3% các loại ung thư [2]. Chẩn đoán UTTTL trước đây chủ yếu dựa vào ba phương tiện: Thăm trực tràng, xét nghiệm nồng độ kháng nguyên đặc hiệu của tuyến tiền liệt (Prostate Specific Antigen: PSA) trong máu ngoại vi và sinh thiết tuyến tiền liệt qua đường trực tràng. Tuy nhiên, thăm trực tràng có độ nhạy thấp (khoảng 20%) với nồng độ PSA từ 0 - 3 ng/ml và khoảng 46% với nồng độ PSA trên 3 ng/ml [3]. Xét nghiệm PSA có độ đặc hiệu thấp chỉ khoảng 36% vì một số các tổn thương lành tính cũng có thể làm tăng PSA máu [4]. Sinh thiết TTL qua đường trực tràng mặc dù là tiêu chuẩn vàng nhưng cũng bỏ sót 35% trường hợp UTTTL trong lần sinh thiết đầu tiên, tăng các biến chứng do sinh thiết không cần thiết [5]. Bởi vậy cần một phương tiện chẩn đoán hình ảnh mới, có thể cải thiện tỷ lệ phát hiện UTTTL, đó là phương pháp chụp CHT [3].

Những năm gần đây đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới về CHT khuếch tán trong chẩn đoán UTTTL và phân biệt ung thư với các tổn thương khác ở TTL. Tuy nhiên, trong nước hiện chưa có nhiều đề tài nghiên cứu đầy đủ về vai trò của

CHT khuếch tán trong chẩn đoán UTTTL. Vì vậy, chúng tôi tiến hành: *Nghiên cứu giá trị cộng hưởng từ khuếch tán trong chẩn đoán ung thư tuyến tiền liệt* nhằm xác định giá trị phương pháp này trong chẩn đoán UTTTL.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

56 BN đến khám tại Bệnh viện K3 cơ sở Tân Triều từ 01/2020 - 12/2020 nghi ngờ UTTTL.

* *Tiêu chuẩn lựa chọn:*

- Bệnh nhân nghi ngờ UTTTL qua thăm trực tràng, siêu âm TTL hoặc định lượng PSA máu, được chụp CHT TTL có tổn thương nguy cơ cao là UTTTL bao gồm một trong số các trường hợp sau:

+ CHT TTL có kết quả PI-RADS 4 hoặc 5.

+ CHT TTL có kết quả PI-RADS ≤ 3 .

+ Thăm trực tràng sờ thấy nhân cứng ở TTL hoặc TTL kém di động.

+ PSA ≥ 10 ng/ml.

+ PSA từ 4 - 10 ng/ml và fPSA $\leq 20\%$.

+ Siêu âm qua ngã trực tràng phát hiện nhân giảm âm, tăng tín hiệu mạch trên Doppler.

- Các BN đều có kết quả giải phẫu bệnh bằng sinh thiết TTL hoặc sau mổ cắt toàn bộ tuyến.

* *Tiêu chuẩn loại trừ:*

- Những BN UTTL đã phẫu thuật triệt để hoặc đã điều trị bằng xạ trị, hormone.
- Những BN không có đầy đủ hồ sơ.
- Những BN có chất lượng hình ảnh CHT không tốt.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế nghiên cứu:* Mô tả cắt ngang, tiến cứu kết hợp với hồi cứu (29 ca tiến cứu, 27 ca hồi cứu).

* *Các bước tiến hành:*

+ Thu thập thông tin hành chính của các BN đủ tiêu chuẩn theo bệnh án mẫu.

+ Phân tích hình ảnh CHT đa thông số có xung khuếch tán (xung T1W axial; T2W axial, sagital, coronal; xung khuếch tán DW: b0, b1000, ADC map với FOV: 200 x 200 và độ dày lát cắt: 5 mm.

- Đo thể tích TTL: Chúng tôi đo ba chiều của tuyến tiền liệt trên xung T2W và tính theo công thức ($1g = 1cm^3$):

$$V (cm^3) = \text{Chiều cao (cm)} \times \text{Chiều rộng (cm)} \times \text{Chiều dày (cm)} \times 0,523$$

- Đánh giá định tính: Tổn thương được xem là hạn chế khuếch tán khi tín

hiệu DWI cao và ADC giảm so với mô xung quanh.

- Đánh giá định lượng: Bảng đo giá trị ADC trên trạm xử lý hình ảnh Ziostation2-version 2.9, 7.2 của Ziosoft. Giá trị ADC được xác định bằng cách sử dụng công cụ ROI. Khi đặt ROI tránh các vùng hoại tử, nang hóa, xuất huyết, vôi hóa, lấy giá trị ADC thấp nhất (minADC).

- Đối chiếu kết quả CHT và kết quả giải phẫu bệnh.

* *Phân tích và xử lý số liệu:* Nhập liệu và xử lý số liệu dựa vào phần mềm thống kê SPSS 20.0.

- Số trung bình (\bar{X}), độ lệch chuẩn (SD), tỷ lệ phần trăm (%).

- So sánh các số trung bình bằng phép kiểm định biến định lượng trên 2 mẫu độc lập (Independent-Sample T-Test và Mann-Whitney U), kiểm định biến định lượng trên mẫu ghép cặp (Pair-Sample T-Test). So sánh tỷ lệ dùng test χ^2 hoặc Fisher's Exact test. Phân tích đường cong ROC các biến số ADC giữa PCa và PNCa để rút ra giá trị ngưỡng với độ nhạy, độ đặc hiệu. Các phép kiểm được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu

Bảng 1: Phân bố ung thư và không ung thư tuyến tiền liệt theo nhóm tuổi (n = 56).

Nhóm tuổi	Tổng (n = 56)		Ung thư (n = 20)		Không ung thư (n = 36)	
	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)
50 - 59	8	14,29	2	10	6	16,67
60 - 69	27	48,21	10	50	17	47,22
70 - 79	12	21,43	6	30	6	16,67
≥ 80	9	16,07	2	10	7	19,44
$\bar{X} \pm SD$	68,68 ± 9,57		68,10 ± 8,57		69,00 ± 10,18	
Min-max	50 - 90		50 - 83		50 - 90	

- Độ tuổi trung bình trong nhóm nghiên cứu là $68,68 \pm 9,57$ (tuổi nhỏ nhất là 50, tuổi lớn nhất là 90); trong đó, độ tuổi trung bình của nhóm UTTTL ($68,10$) thấp hơn độ tuổi trung bình của nhóm không ung thư (69), sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

- Độ tuổi của nhóm ung thư tập trung chủ yếu ở nhóm tuổi từ 60 - 69 tuổi (50%).

Bảng 2: So sánh trọng lượng tuyến tiền liệt của bệnh nhân ung thư và không ung thư ($n = 56$).

Trọng lượng tuyến (gram)	Tổng ($n = 56$)		Ung thư ($n = 20$)		Không ung thư ($n = 36$)		p
	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)	
≤ 25	5	8,93	3	15	2	5,56	$> 0,05$
$> 25 - \leq 40$	12	21,43	4	20	8	22,22	
$> 40 - \leq 60$	21	37,50	9	45	12	33,33	
$> 60 - \leq 80$	11	19,64	3	15	8	22,22	
> 80	7	12,50	1	5	6	16,67	
$\bar{X} \pm SD$	$54,95 \pm 24,63$		$48,00 \pm 20,57$		$58,81 \pm 26,08$		$> 0,05$
Min-max	20 - 140		20 - 106		20 - 140		

Sự khác biệt về trọng lượng TTL trong nhóm đối tượng ung thư và không ung thư không có ý nghĩa thống kê. Trọng lượng trung bình của TTL ở những BN ung thư là 48 gram, ở nhóm không ung thư là 58,81 gram.

Trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi có 3 BN (15%) trọng lượng TTL ≤ 25 gram nhưng vẫn mắc UTTTL.

Nhóm BN có trọng lượng tuyến từ 40 - 60 gram chiếm tỷ lệ ung thư nhiều nhất (45%).

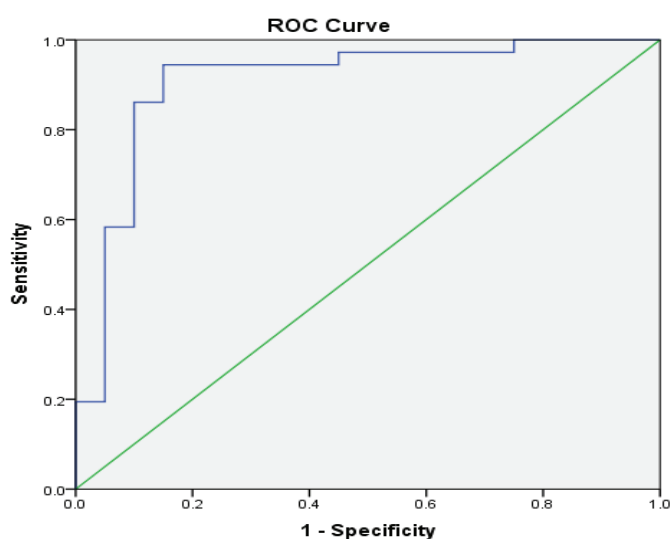
2. Đặc điểm của CHT khuếch tán

* *Đánh giá định lượng:*

Bảng 3: Giá trị minADC ($\times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$) theo mô bệnh học.

Không ung thư		Ung thư		Test kiểm định (T-test)
n (%)	minADC \pm SD	n (%)	minADC \pm SD	
36 (64,29)	$1009,89 \pm 223,81$	20 (35,71)	$590,75 \pm 233,02$	$p < 0,05$

- Giá trị minADC trung bình của tổn thương ung thư là $590,75 \pm 233,02 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, thấp hơn giá trị minADC trung bình ở tổn thương không ung thư là $1009,89 \pm 223,81 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$. Sự khác biệt này là có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.



Biểu đồ 1: Đường cong ROC giá trị minADC của tổn thương phân biệt ung thư hay không ung thư, AUC 0,907.

Từ đường cong ROC, chúng tôi chọn giá trị ngưỡng minADC là $700 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, diện tích dưới đường cong AUC = 0,907. Với giá trị ngưỡng này chúng tôi có bảng sau:

Bảng 4: Phân bố tổn thương UTTTL theo giá trị minADC ngưỡng.

minADC tổn thương	Tổng (n = 56)		Ung thư (n = 20)		Không ung thư (n = 36)	
	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)
$\leq 700,00 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$	19	33,93	17	85,00	2	5,56
$>700,00 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$	37	66,07	3	15,00	34	94,44

Độ nhạy: $17/20 = 85\%$; Độ đặc hiệu: $34/36 = 94,44\%$.

Giá trị dự báo dương tính: $17/19 = 89,47\%$; Giá trị dự báo âm tính: $34/37 = 91,89\%$

Độ chính xác: $(17+34)/56 = 91,07\%$

* Đánh giá định tính:

Bảng 5: Đối chiếu kết quả chẩn đoán UTTTL của chuỗi xung khuếch tán với kết quả GPB.

DW-ADC \ GPB	Tổng (n = 56)		Ung thư (n = 20)		Không ung thư (n = 36)	
	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)
Hạn chế khuếch tán	27	48,21	20	100,00	7	19,44
Không hạn chế khuếch tán	29	51,79	0	0,00	29	80,56

Độ nhạy = 100% ; Độ đặc hiệu = $80,56\%$.

Giá trị dự báo dương tính = $74,07\%$; Giá trị dự báo âm tính = 100% .

BÀN LUẬN**1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu**

Độ tuổi trung bình trong nghiên cứu của chúng tôi là 68,68 tuổi. Có 20 BN được chẩn đoán UTTTL, độ tuổi trung bình của nhóm bệnh là $68,10 \pm 8,57$, trong đó 50% BN thuộc nhóm tuổi 60 - 69 tuổi. Nghiên cứu của nhóm Hoàng Văn Đồng (2018) trên 652 BN, độ tuổi trung bình của BN UTTTL là 68 tuổi, chủ yếu từ 64 - 75 tuổi [6].

Tỷ lệ BN UTTTL có trọng lượng tuyến > 25 gram chiếm 85%, trong đó thể tích tuyến > 40 gram chiếm 65%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Guillaume Guichard, có tỷ lệ BN có thể tích > 35 gram là 64% [7].

Trọng lượng trung bình của TTL trong nhóm BN ung thư mà chúng tôi nghiên cứu là 48 gram. Kết quả khá phù hợp với nghiên cứu tác giả Trần Thị Linh là 51,65 gram [1]. Nhưng cao hơn so với Guillaume Guichard và CS với trọng lượng TTL trung bình trong nhóm BN UTTTL là 43,8 gram [7]. Điều này có thể do cỡ mẫu khác nhau.

2. Giá trị chẩn đoán UTTTL của CHT khuếch tán

Khi nghiên cứu đánh giá định lượng CHT khuếch tán của tổn thương, chúng tôi tiến hành đo giá trị ADC tại vị trí tổn thương để khẳng định hạn chế khuếch tán. Giá trị minADC trung bình ở tổn thương ung thư là $590,75 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, tổn thương không ung thư cao hơn là $1009,89 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$. Tác giả Chiho Sato (2005) kết luận tổn thương không ung thư có giá trị ADC trung bình là $1,68 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$,

cao hơn tổn thương ung thư $1,11 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ [8].

Chúng tôi phân tích đường cong ROC để đưa ra ngưỡng giá trị ADC tổn thương phân biệt ung thư hay không ung thư. Đường cong ROC này cho giá trị AUC = 0,907, cho thấy đây là một phương pháp chẩn đoán rất tốt. Giá trị ngưỡng ADC là $700 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, với độ nhạy 85,00%, độ đặc hiệu 94,44%. Những tổn thương ác tính thường giảm tín hiệu trên ADC và giá trị ADC thấp. Với giá trị ngưỡng ADC trên cho độ nhạy và đặc biệt là độ đặc hiệu khá cao.

Virendra Kumar nghiên cứu trên cỡ mẫu là 60 BN, đã đưa ra giá trị ngưỡng của ADC phân biệt giữa tổn thương ung thư và không ung thư là $1,17 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ với độ nhạy là 73%, độ đặc hiệu là 74%, giá trị AUC là 0,83 [9]. Trong nước, nghiên cứu của Trần Thị Linh (2020), sử dụng đường cong ROC chọn giá trị $868,4 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ là giá trị ngưỡng của ADC với AUC = 0,988, có độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng là 90,41% và 95,12%. Khi tổn thương có giá trị ADC trung bình thấp hơn giá trị ngưỡng thì khả năng nghĩ tới ung thư nhiều hơn [1].

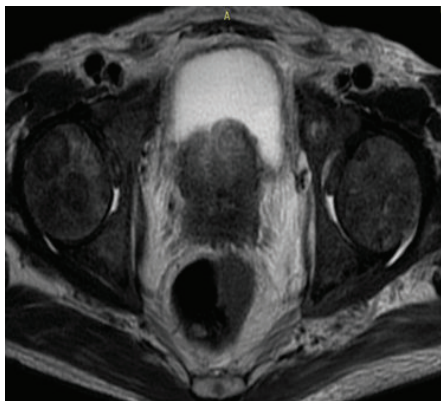
Khi các khối u ở vùng trung tâm, DWI có giá trị phát hiện UTTTL cao hơn xung T2W, nhất là khi u đã xâm lấn túi tinh. Trong UTTTL các khối u biểu hiện là vùng tăng tín hiệu trên DWI và giảm tín hiệu trên bản đồ ADC. Nhưng do DWI hạn chế trong việc đánh giá vị trí giải phẫu nên vẫn cần phải kết hợp với T2W.

Qua nghiên cứu này chúng tôi nhận thấy chỉ riêng chuỗi xung DWI cùng với ADC trong chẩn đoán UTTTL có độ nhạy là 100%, độ đặc hiệu là 80,56%, giá trị dự báo dương tính 74,07%, giá trị dự báo

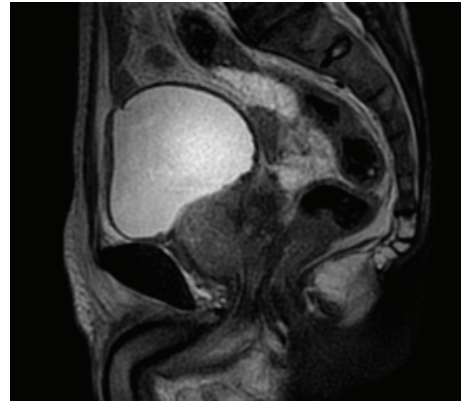
âm tính là 100%. Kết quả này cũng tương đồng với nhóm tác giả M. Chen với độ nhạy, độ đặc hiệu của xung khuếch tán trong chẩn đoán UTTTL là 82,4% và 81,6% [10].

Bên cạnh đó, nghiên cứu của chúng tôi cũng có những điểm hạn chế. Vùng

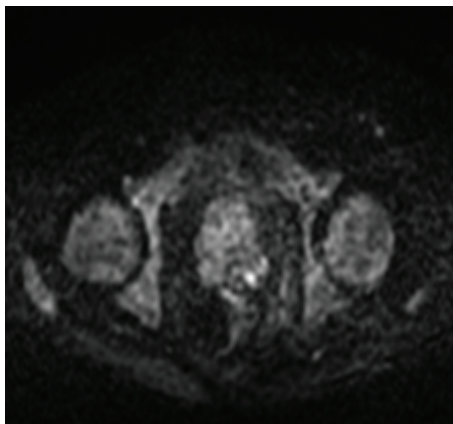
đánh giá hạn chế khuếch tán và vị trí sinh thiết không phải lúc nào cũng trùng lặp hoàn toàn nên sẽ có những trường hợp âm tính giả và dương tính giả. Tuy nhiên, chúng tôi cũng theo dõi và không ghi nhận BN có chẩn đoán khác trong thời gian nghiên cứu.



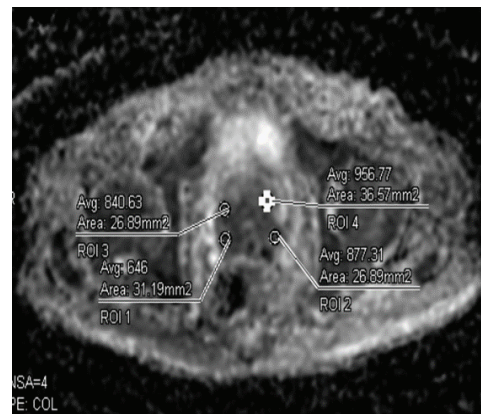
A



B



C



D

Trường hợp minh họa: Bệnh nhân N.H.Q, nam, 71 tuổi, PSA: 118g/ml.

Hình (A) T2W axial và (B) T2W sagital: Tổn thương giảm tín hiệu lan tỏa cả vùng ngoại vi và chuyển tiếp hai bên, ranh giới không rõ, phá vỡ vỏ bao tuyến tiền liệt, xâm lấn túi tinh hai bên. Trên DWI (C) tổn thương tăng tín hiệu thùy phải. Trên ADC (D) tổn thương giảm tín hiệu so với mô tuyến xung quanh, đo giá trị ADC thấp nhất là $646 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$, cao hơn vùng bình thường là $957 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$. Kết quả giải phẫu bệnh: Adenocarcinoma tuyến tiền liệt, Gleason: 9 điểm.

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu 56 BN nghi ngờ UTTTL được chụp CHT khuếch tán, kết quả cho thấy ngưỡng minADC là $700,00 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$ có giá trị chẩn đoán UTTTL cao. Sử dụng CHT khuếch tán chẩn đoán UTTTL có độ nhạy, độ đặc hiệu tương ứng 100% và 80,56%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Linh. Nghiên cứu giá trị của cộng hưởng từ khuếch tán trong chẩn đoán UTTTL. Luận văn Bác sĩ nội trú, Trường Đại học Y Hà Nội 2020.
2. Hyuna Sung, Rebecca L. Siegel, Jacques Ferlay, et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 0:1-41.
3. Fritz H. Schroder, Paul van der, Maas, et al. (). Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1998; 90(23):1817-1823.
4. Gillian Murphy, Masoom Haider, Sangeet Ghai, et al. The expanding role of MRI in prostate cancer. *AJR* 2013; 201:1229-1238.
5. Friedrich Aigner, Leo Pallwein, Alexandre Pelzer, et al. Value of magnetic resonance imaging in prostate cancer diagnosis. *World J Urol* 2007; 25:351-359.
6. Dong Van Hoang, Ngoc Minh Pham, Andy H. Lee, et al. Dietary carotenoid intakes and prostate cancer risk: A case-control study from Vietnam. *Nutrients* 2018; 10(1):70.
7. Guillaume Guichard, Ste'phane Larre, et al. Extended 21-sample needle biopsy protocol for diagnosis of prostate cancer in 1000 consecutive patients. *European Urology* 2007; 52:430-435.
8. Chiho Sato, Shinji Naganawa, et al. Differentiation of noncancerous tissue and cancer lesions by apparent diffusion coefficient values in transition and peripheral zones of the prostate. *J Magn Reson Imaging* 2005; 21(3):258-262.
9. Virendra Kumar, N. R. Jagannathan, et al. Apparent diffusion coefficient of the prostate in men prior to biopsy: Determination of a cut-off value to predict malignancy of the peripheral zone. *NMR Biomed* 2007; 20(5):505-511.
10. M. Chen, H.-D. Dang, et al. Prostate cancer detection: Comparison of T2-weighted imaging, diffusion-weighted imaging, proton magnetic resonance spectroscopic imaging, and the three techniques combined. *Acta Radiol* 2008; 49(5):602-610.