

高海拔地区新生血管性青光眼不同治疗方式的疗效及对房水中 PEDF、VEGF 水平的影响

卫钦锋

作者单位:(810000)中国青海省西宁市第二人民医院眼科
作者简介:卫钦锋,毕业于青海大学医学院,本科,副主任医师,眼科主任,研究方向:青光眼、白内障。
通讯作者:卫钦锋. leu4ne@163.com
收稿日期:2017-08-27 修回日期:2018-01-03

Efficacy of different treatment modalities and the influence on PEDF and VEGF in patients with neovascular glaucoma in high altitude area

Qin-Feng Wei

Department of Ophthalmology, Second People's Hospital, Xining 810000, Qinghai Province, China

Correspondence to: Qin-Feng Wei. Department of Ophthalmology, Second People's Hospital, Xining 810000, Qinghai Province, China. leu4ne@163.com

Received: 2017-08-27 Accepted: 2018-01-03

Abstract

• AIM: To observe the clinical efficacy of different treatment modalities and the influence on the levels of pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with neovascular glaucoma (NVG) in high altitude area.

• METHODS: Ninety cases of patients (90 eyes) with NVG treated in our hospital were selected as the study objects, and they were divided into Group A and Group B according to different surgery methods, 45 cases in each groups. Group A was given Ex-press glaucoma drainage device implantation, and Group B was given trabeculectomy combined with cyclocryotherapy. We observed the clinical efficacy, intraocular pressure and visual acuity in the two groups, detected the PEDF and VEGF levels in the aqueous humor, and recorded the postoperative complications.

• RESULTS: The total effective rate of Group A was 91%, significantly higher than that of Group B 76% ($P < 0.05$). At 2wk, 2 and 4mo after surgery, IOP levels were significantly lower than that before surgery ($P < 0.05$), and those in Group A were significantly lower than those in Group B ($P < 0.05$). There was no significantly difference in IOP levels at 6mo after surgery between the two groups ($P > 0.05$). At 1wk after operation, the incidence of visual reduction in Group A was 7%, significantly lower than that in Group B 22% ($P < 0.05$). At 1wk after operation, PEDF levels were significantly higher than those before

operation in the two groups ($P < 0.05$), and that in Group A was significantly higher than that in Group B ($P < 0.05$); VEGF levels were significantly lower than that before operation in the two groups ($P < 0.05$), and that in Group A was significantly lower than that in Group B ($P < 0.05$). The incidence rate of complications in Group A was 4%, significantly lower than that of 18% in Group B at 6mo postoperatively ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: Ex-press glaucoma drainage device implantation, trabeculectomy combined with cyclocryotherapy can both be used to treat patients with NVG in high altitude area. But the former can effectively maintain visual acuity, and improve PEDF and VEGF levels in aqueous humor, with fewer complications and more accurate curative effect.

• KEYWORDS: neovascular glaucoma; drainage device implantation; trabeculectomy; clinical efficacy; pigment epithelium-derived factor

Citation: Wei QF. Efficacy of different treatment modalities and the influence on PEDF and VEGF in patients with neovascular glaucoma in high altitude area. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(2): 286-289

摘要

目的: 观察高海拔地区新生血管性青光眼(neovascular glaucoma, NVG)不同治疗方式的疗效及对房水中色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平的影响。

方法: 选取我院收治的 NVG 患者 90 例 90 眼作为研究对象, 术前两组均给予甘露醇降眼压和抗炎滴眼液治疗, 按照手术方式不同分为 A 组和 B 组, 各 45 例 45 眼, 其中 A 组给予 Ex-press 青光眼引流器植入术, B 组给予小梁切除术联合睫状体冷凝术。观察两组临床疗效、眼压和视力水平, 检测房水中 PEDF、VEGF 水平, 比较术后并发症情况。
结果: A 组临床疗效显著高于 B 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后 2wk, 2、4mo, 两组眼压水平均显著低于术前($P < 0.05$), 且 A 组显著低于 B 组($P < 0.05$); 术后 6mo, 两组眼压水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。术后 1wk, 两组视力比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后 1wk, 两组患者房水中 PEDF 水平均显著高于术前($P < 0.05$), 且 A 组显著高于 B 组($P < 0.05$), 两组患者房水中 VEGF 水平均显著低于术前($P < 0.05$), 且 A 组显著低于 B 组($P < 0.05$)。术后随访 6mo, A 组并发症发生率(4%)显著低于 B 组(18%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: Ex-press 青光眼引流器植入术、小梁切除术联合睫

状体冷凝术均可用于治疗高海拔地区 NVG,但前者可有效维持视力,改善房水中 PEDF、VEGF 水平,并发症少,疗效更确切。

关键词:新生血管性青光眼;引流器植入术;小梁切除术;临床疗效;色素上皮衍生因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.2.20

引用:卫钦锋. 高海拔地区新生血管性青光眼不同治疗方式的疗效及对房水中 PEDF、VEGF 水平的影响. 国际眼科杂志 2018; 18(2):286-289

0 引言

新生血管性青光眼(neovascular glaucoma, NVG)属于临床常见继发性青光眼,主要症状为疼痛、角膜水肿等,其发病率呈上升趋势,治疗不及时可引起视神经萎缩,严重时致盲。据调查^[1], NVG 致盲率高达 92.4%,严重影响患者生活质量。目前手术是治疗 NVG 的主要方法,小梁切除术、睫状体冷凝术等均是临床常用手术方法,能够改善临床症状,但缺点较多,可造成眼球萎缩、低眼压等并发症,整体治疗效果不理想^[2]。Ex-press 青光眼引流器植入术属于微创青光眼滤过手术,操作简单,可减少对眼组织损伤^[3]。但目前关于小梁切除术联合睫状体冷凝术与 Ex-press 青光眼引流器植入术治疗 NVG 的效果及安全性均存在争议。基于此,本研究以期为此类患者临床手术方案的选择提供参考。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2014-03/2016-01 我院收治的 NVG 患者 90 例 90 眼作为研究对象,按照手术方式不同分为 A 组和 B 组。A 组 45 例 45 眼,其中男 23 例 23 眼,女 22 例 22 眼;年龄 21~67(平均 45.39±10.24)岁;病程 1~5(平均 3.69±1.01) a;左眼发病 25 例 25 眼,右眼发病 20 例 20 眼;致病原因:糖尿病视网膜病变 15 例 15 眼、视网膜中央静脉阻塞 13 例 13 眼、葡萄膜炎 11 例 11 眼、高血压动脉硬化 6 例 6 眼。B 组 45 例 45 眼,其中男 24 例 24 眼,女 21 例 21 眼;年龄 24~63(平均 45.48±10.33)岁;病程 1~6(平均 3.74±1.06) a;左眼发病 26 例 26 眼,右眼发病 19 例 19 眼;致病原因:糖尿病视网膜病变 16 例 16 眼、视网膜中央静脉阻塞 14 例 14 眼、葡萄膜炎 10 例 10 眼、高血压动脉硬化 5 例 5 眼。两组患者性别、年龄、病程、眼别、致病原因等一般资料比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准,患者均知情同意并签署知情同意书。

1.1.1 纳入标准 (1)符合《眼科学》中关于 NVG 的诊断标准;(2)年龄≥18 岁;(3)眼压≥21mmHg;(4)均为单眼发病。

1.1.2 排除标准 (1)需行眼球摘除术者;(2)先天性、外伤性等其它类型青光眼;(3)角膜白斑、晶状体混浊、玻璃体积血等无法行全视网膜激光凝固术(PRP);(4)眼内活动性出血或合并炎症;(5)既往接受青光眼手术治疗者;(6)手术禁忌证或不能耐受手术者。

1.2 方法 两组患者均于玻璃体腔内注射 0.1mL 雷珠单抗,3~5d 后行 PRP 治疗。PRP 术后 7d 行 Ex-press 青光眼引流器植入术或小梁切除术联合睫状体冷凝术,手术均由同一组医生完成。

1.2.1 Ex-press 青光眼引流器植入术 A 组患者给予

Ex-press 青光眼引流器植入术。对术眼实施常规消毒、铺巾,使用盐酸奥布卡因进行表面麻醉,开睑器开睑后固定上直肌,将上穹隆部作为基底做一个结膜瓣,长度约 6mm,烧灼止血;以角膜缘为基底做方形巩膜瓣,约 4mm×4mm,厚度约为巩膜厚度的一半。将棉片浸入丝裂霉素 C 稀释液中,取出后置于结膜瓣和巩膜瓣下方,2min 后使用氯化钠溶液冲洗。于角膜缘行前方穿刺,在巩膜瓣下使用 25 G 针头做预置切口,将 Ex-press 青光眼引流器经该切口植入并固定,于巩膜瓣后角进行缝合固定,间断缝合角膜缘处的球结膜,将眼前房灌注液(BSS)由前房穿刺口注入直至前房深度正常,妥布霉素地塞米松眼膏均匀涂抹于结膜囊内,使用无菌纱布覆盖术眼。

1.2.2 小梁切除术联合睫状体冷凝术 B 组患者给予小梁切除术联合睫状体冷凝术。对术眼实施常规消毒、铺巾,将利多卡因和布比卡因进行等量混合,行球后阻滞麻醉。开睑后打开球结膜,牵引并固定直肌,于角膜缘后 2mm 的巩膜表面使用方形冷冻笔进行冷冻,冷冻点依次排序且间隔约 2mm,冷冻时间 1min,范围为 1/2 象限;冷冻头温度为 -60℃~-70℃,共 7~8 点。行常规小梁切除术时结膜瓣、巩膜瓣制作同 A 组,于角膜缘使用穿刺刀做前房穿刺口,将小梁组织和巩膜周边进行切除,使用可调节方式缝合巩膜瓣游离端角和两侧,并缝合球结膜。于前房穿刺口注入 BSS 直至前房深度恢复正常,将妥布霉素地塞米松眼膏涂于结膜囊内,无菌纱布覆盖术眼。

1.2.3 术后处理 术后两组患者均给予妥布霉素地塞米松滴眼液、左氧氟沙星滴眼液,3~4 次/d;如疼痛给予激素抗炎治疗;如出血给予云南白药胶囊或甘露醇治疗。

1.2.4 观察指标

1.2.4.1 房水检测 分别于术前(入院时)、术后(全部手术完毕)1wk,采用一次性无菌胰岛素注射器,由角膜缘穿刺口进入前房引流房水,每次收集房水 150μL,注入无菌 Ep 管中,并置于 -80℃ 冰箱中进行保存。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测房水中色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达水平,检测试剂盒购自美国 USCN 公司,具体操作严格按照试剂盒说明书进行,并按照仪器操作规程进行质控。

1.2.4.2 最佳矫正视力 于术前及术后 1wk 使用国际标准视力表检测最佳矫正视力。视力评价标准:(1)提高:增加一个低视力分级或视力提高≥2 行;(2)不变:视力变化不超过视力表一行;(3)降低:降低一个低视力分级或视力降低≥2 行。

1.2.4.3 眼压 两组患者分别于术前、术后 2wk,2、4、6mo 使用眼压计测量眼压。

1.2.5 随访观察 术后随访 6mo,观察是否出现角膜水肿、前房积血、前房内纤维素样渗出等并发症发生情况及术后虹膜新生血管消退情况。

疗效评定标准:根据临床症状和眼压评估临床疗效。(1)显效:眼痛、角膜水肿等临床症状显著改善,视力明显恢复,眼内压<22mmHg;(2)有效:眼痛、角膜水肿等临床症状有所改善,视力有所恢复,眼内压为 22~32mmHg;(3)无效:眼痛、角膜水肿等临床症状无改善甚至加重,视力无改变,眼内压>32mmHg。总有效率=(显效眼数+有效眼数)/总眼数×100%。

表1 两组患者临床疗效的比较

组别	眼数	显效	有效	无效	总有效率
A组	45	32(71)	9(20)	4(9)	41(91)
B组	45	21(47)	13(29)	11(24)	34(76)

注:A组:行Ex-press青光眼引流器植入术;B组:行小梁切除术联合睫状体冷凝术。

表2 两组患者眼压水平的比较

组别	眼数	术前	术后2wk	术后2mo	术后4mo	术后6mo
A组	45	43.68±8.26	16.76±4.12	15.86±4.04	15.94±4.13	15.53±4.01
B组	45	43.57±8.31	20.37±5.20	19.72±4.27	18.65±4.22	16.49±4.16
<i>t</i>		0.063	3.650	4.405	3.079	1.231
<i>P</i>		0.950	<0.001	<0.001	0.003	0.222

注:A组:行Ex-press青光眼引流器植入术;B组:行小梁切除术联合睫状体冷凝术。

表3 两组患者术后1wk视力的比较

组别	眼数	视力提高	视力不变	视力降低
A组	45	3(7)	39(87)	3(7)
B组	45	1(2)	32(71)	12(27)

注:A组:行Ex-press青光眼引流器植入术;B组:行小梁切除术联合睫状体冷凝术。

表4 两组患者手术前后房水中PEDF和VEGF水平的比较

组别	眼数	PEDF		<i>t</i>	<i>P</i>	VEGF		<i>t</i>	<i>P</i>
		术前	术后1wk			术前	术后1wk		
A组	45	216.49±32.41	286.59±43.17	8.711	<0.01	286.74±31.25	217.53±20.14	12.488	<0.01
B组	45	218.62±32.56	245.79±36.51	3.726	0.031	284.69±31.22	247.71±24.39	6.262	0.009
<i>t</i>		0.311	4.841			0.311	6.401		
<i>P</i>		0.757	0.023			0.756	0.008		

注:A组:行Ex-press青光眼引流器植入术;B组:行小梁切除术联合睫状体冷凝术。

统计学分析:采用SPSS18.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 描述,重复测量数据采用重复测量数据的方差分析,若差异有统计学意义则进一步进行比较,组间比较采用独立样本*t*检验,组内两两比较采用LSD-*t*检验;治疗前后组内比较采用配对样本*t*检验。计数资料用率描述,组间比较采用卡方检验。等级资料的比较采用Wilcoxon秩和检验。*P*<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组临床疗效的比较 A组患者临床疗效显著高于B组,差异有统计学意义($Z=6.277, P=0.043$),见表1。

2.2 两组眼压的比较 手术前后,两组患者眼压比较,差异有统计学意义($F_{\text{组间}}=12.365, P<0.01; F_{\text{时间}}=10.325, P_{\text{时间}}=0.005; F_{\text{交互}}=12.097, P_{\text{交互}}<0.01$)。术前、术后6mo,两组眼压分别进行比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);术后2wk,2,4mo,两组眼压分别进行比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。A组:术后2wk,2,4,6mo眼压分别与术前比较,差异均有统计学意义($t=15.876, 20.296, 20.150, 20.566, P<0.001$);术后2,4,6mo眼压分别与术后2wk比较,差异均无统计学意义($t=1.046, 0.943, 1.435, P=0.298, 0.348, 0.155$);术后4,6mo眼压分别与术后2mo比较,差异均无统计学意义($t=0.093, 0.389, P=0.926, 0.698$);术后6mo眼压与术后4mo比较,差异无统计学意义($t=0.478, P=0.634$)。B组:术后2wk,2,4,6mo眼压分别与术前比较,差异均有统计学意义($t=15.876, 17.124, 17.936, 19.548, P<0.001$);术后2,4mo眼

压分别与术后2wk比较,差异均无统计学意义($t=0.648, 1.723, P=0.519, 0.088$),术后6mo眼压与术后2wk比较,差异有统计学意义($t=3.909, P<0.001$);术后4mo眼压与术后2mo比较,差异无统计学意义($t=1.196, P=0.235$),术后6mo眼压与术后2mo比较,差异有统计学意义($t=3.635, P<0.001$);术后6mo眼压与术后4mo比较,差异有统计学意义($t=2.445, P=0.016$),见表2。

2.3 两组视力的比较 术后1wk,两组视力比较,差异具有统计学意义($Z=7.090, P=0.029$),见表3。

2.4 两组房水中PEDF和VEGF水平的比较 术前两组患者房水中PEDF、VEGF水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。术后1wk,两组患者房水中PEDF水平均显著高于术前,且A组显著高于B组,差异均有统计学意义($P<0.05$);两组患者房水中VEGF水平均显著低于术前,且A组显著低于B组,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表4。

2.5 术后情况 术后随访6mo,A组出现前房积血1例1眼、角膜水肿1例1眼,并发症发生率为4%;B组出现角膜水肿4例4眼、前房积血2例2眼、前房内纤维素样渗出2例2眼,并发症发生率为18%,两组患者并发症发生率比较,差异有统计学意义($\chi^2=4.050, P=0.044$)。给予按摩眼球,促进血液吸收药物以及高糖点眼等对症治疗后,并发症均消失。随访期间,A组患者巩膜新生血管消退率为51%(23/45),B组为78%(35/45),差异具有统计学意义($\chi^2=3.021, P=0.047$)。

3 讨论

NVG 在高海拔地区较为常见,由于机体长期处于低氧环境下,再加上眼部长期暴露,受到紫外线辐射,导致视网膜缺氧,从而产生血管形成因子,进而刺激虹膜产生新生血管,并向虹膜周围延伸,导致眼压升高,最终形成 NVG。此外,虹膜产生新生血管,并于房角形成纤维血管膜,造成房角粘连,阻断房水外流,可导致眼压升高,最终引起视力丧失^[4]。高海拔地区 NVG 病因较为复杂,主要由视网膜缺氧引起^[5],而正常海拔则是由糖尿病视网膜病变引起。视网膜受到缺血缺氧刺激,可产生 VEGF,作为血小板源性蛋白,其可刺激血管内皮细胞增殖,促进新生血管形成。有资料显示^[6],VEGF 在 NVG 发展过程中发挥重要作用,通过与其在血管内皮细胞中的受体结合,从而促进血管内皮细胞进行有丝分裂。另有研究表明^[7],抑制 VEGF 与其受体结合,可有效阻断新生血管形成。PEDF 存在于眼部多个组织中,可抑制 VEGF、血小板衍生因子等,是血管生成抑制剂,能够有效保护视网膜。

近年来玻璃体腔注射抗 VEGF 药物是眼科治疗 NVG 的重大进展。抗 VEGF 药物能够通过与 VEGF 亚型结合促使其活性丧失,进而阻断一系列级联反应,抑制新生血管生成,同时快速消退已产生的血管,其与手术联合治疗起到辅助作用,疗效更佳。目前对于药物注射的时间和剂量均存在争议,有待进一步商榷。本研究中所用手术方式是临床治疗 NVG 常用术式,能够直接、快速对患者实施手术。目前小梁切除术联合睫状体冷凝术是临床治疗 NVG 常用手术,具有双重降眼压作用,在减少房水同时也解决了引流问题^[8],该手术的优势在于能够保留上方睫状体功能,从而降低眼球萎缩发生率,联合手术可避免术后眼压反应性升高^[9]。Ex-press 青光眼引流器属于新型房水引流装置,其所使用的不锈钢材料与人工心脏瓣膜材料相同,具有良好的生物相容性,可减少局部组织氧耗,抑制瘢痕形成,提高手术成功率^[10],该手术无需切除小梁和虹膜根部组织,可减少术中出血,便于术后房水引流^[11]。

本研究通过对比 Ex-press 青光眼引流器植入术、小梁切除术联合睫状体冷凝术治疗 NVG 的效果,发现前者总有效率优于后者,原因是前者能够统一、固定地对房水进行引流,并具有可预测性的特点;后者手术破坏性较大,可导致滤过道瘢痕化,降低手术效果^[12]。有研究表明^[13],采用 Ex-press 青光眼引流器植入术治疗 NVG 可有效降低眼压。本研究结果显示,A 组术后 2wk,2,4mo 眼压水平均低于 B 组,与上述研究结果相似,原因是 Ex-press 青光眼引流器植入术可降低眼内 VEGF 水平,降低滤过道瘢痕化风险,从而稳定眼压。A 组视力维持优于 B 组,其原因在于 Ex-press 青光眼引流器植入术可有效稳定术后早期眼压,避免损害视神经,并能加快恢复角膜水肿。本研究对 NVG 患者手术前后房水中 PEDF、VEGF 水平进行检测发

现,术后 1wk A 组患者房水中 PEDF 水平高于 B 组,而 VEGF 水平低于 B 组,提示 Ex-press 青光眼引流器植入术可有效改善 NVG 患者房水中 PEDF、VEGF 水平。本研究对手术安全性进行观察,发现 A 组并发症低于 B 组,提示采用 Ex-press 青光眼引流器植入术可减少术后并发症,原因与该手术创口出血少,对眼组织的破坏小有关。

综上所述,Ex-press 青光眼引流器植入术、小梁切除术联合睫状体冷凝术均可用于治疗高海拔地区 NVG,而前者可有效维持和改善视力水平,降低眼压,减少术后并发症,改善房水中 PEDF、VEGF 水平,提高临床疗效。但本研究仍存在一定的局限性:(1)样本量较少,未对远期疗效进行追踪观察;(2)未与术前眼内注射抗 VEGF 药物等最新研究进展的疗效进行对比分析。因此,今后将在扩大样本数量基础上,对最新研究进展与本研究所用方法进行深入探讨分析。

参考文献

- 1 徐向忠,姚进,宋雨晨,等. 抗 VEGF 联合 Ex-press 青光眼引流器植入治疗新生血管性青光眼. 国际眼科杂志 2016;16(8):1564-1566
- 2 代应辉,李娟,王剑锋,等. 前部视网膜、睫状体冷凝联合复合式小梁切除术治疗新生血管性青光眼的临床研究. 眼科新进展 2012;32(6):586-588
- 3 祝莹,李军,徐少凯. Ex-PRESS 青光眼引流器植入治疗新生血管性青光眼的疗效观察. 国际眼科杂志 2015;15(3):534-536
- 4 白玉星,李静,田立艳,等. 不同手术方案治疗新生血管性青光眼对血清及房水中 IL-6、PEDF、VEGF 水平的影响比较. 临床合理用药杂志 2015;8(1):161-162
- 5 Moisseiev E, Zunz E, Tzur R, et al. Standard trabeculectomy and Ex-PRESS miniature glaucoma shunt: a comparative study and literature review. *J Glaucoma* 2015;24(6):410-416
- 6 张怡,蒋妹乐,柳婷,等. 雷珠单抗对新生血管性青光眼患者血清、房水 IL-6 及 VEGF 水平的影响. 中国生化药物杂志 2016;36(2):151-153
- 7 陈宁宁,张奕霞,李彩云,等. 不同术式治疗新生血管性青光眼的疗效比较. 现代生物医学进展 2014;14(3):515-517
- 8 万道红,赵强. 小梁切除术联合丝裂霉素和干扰素治疗新生血管性青光眼疗效观察. 国际眼科杂志 2015;15(1):146-148
- 9 王丹,王淑霞,楚建设. 青光眼引流阀植入联合视网膜激光凝固术治疗新生血管性青光眼的疗效观察. 吉林医学 2014;35(19):4272-4273
- 10 Waisbourd M, Fischer N, Shalev H, et al. Trabeculectomy with Ex-PRESS implant versus Ahmed glaucoma valve implantation - a comparative study. *Int J Ophthalmol* 2016;9(10):1415-1420
- 11 张启珍,罗顺利,王勤. 改良小梁切除术联合睫状体视网膜凝固治疗新生血管性青光眼. 眼科新进展 2013;33(7):688-690
- 12 张雪翎,李甦雁,张正培,等. 青光眼引流阀植入与小梁切除术治疗新生血管性青光眼的疗效比较. 国际眼科杂志 2014;14(2):349-351
- 13 孙明伟,刘湘云,赵春梅,等. Ex-PRESS 青光眼引流器植入术治疗新生血管性青光眼降眼压效果观察. 中国地方病防治杂志 2014;29(S2):245-246