

个体化预测视网膜静脉阻塞性黄斑水肿患者复发风险的模型构建

范俊,周美池,韦牡

引用:范俊,周美池,韦牡.个体化预测视网膜静脉阻塞性黄斑水肿患者复发风险的模型构建.国际眼科杂志,2024,24(2):284-288.

作者单位:(545001)中国广西壮族自治区柳州市红十字会医院眼科

作者简介:范俊,男,本科,副主任医师,研究方向:眼底病、眼视光。

通讯作者:范俊.314696912@qq.com

收稿日期:2023-10-05 修回日期:2024-01-04

摘要

目的:分析影响视网膜静脉阻塞(RVO)性黄斑水肿(ME)患者复发的因素并构建列线图模型。

方法:回顾性研究。纳入本院2019-01/2022-06期间收治的RVO性ME患者306例为研究对象,按7:3分为建模组214例214眼和验证组92例92眼。所有患者经抗血管内皮生长因子(VEGF)治疗后随访1a,根据建模组患者是否复发分为复发组($n=66$)和未复发组($n=148$)。收集临床资料并采用多因素Logistic回归分析确定RVO性ME患者复发的影响因素;R3.6.3软件构建预测RVO性ME患者复发风险的列线图模型;ROC曲线和校准曲线评估列线图模型预测RVO性ME患者复发风险的区分度和一致性。

结果:未复发组和复发组患者治疗前黄斑中心凹视网膜厚度(CRT)、病程、高反射灶(HF)、视网膜内层结构紊乱、注药次数比较均有差异(均 $P<0.05$)。多因素Logistic回归分析结果显示,治疗前CRT($OR=1.011$)、病程($OR=1.104$)、HF($OR=5.074$)、视网膜内层结构紊乱($OR=4.640$)、注药次数($OR=4.036$)是RVO性ME患者复发的影响因素(均 $P<0.01$)。建模组ROC曲线下面积为0.924(95%CI:0.882-0.966),校准曲线斜率接近1,Hosmer-Lemeshow拟合优度检验结果显示 $\chi^2=11.817,P=0.160$;验证组ROC曲线下面积为0.939(95%CI:0.892-0.985),校准曲线斜率接近1,Hosmer-Lemeshow拟合优度检验结果显示 $\chi^2=6.082,P=0.638$ 。

结论:治疗前CRT、病程、HF、视网膜内层结构紊乱、注药次数是RVO性ME患者复发的独立危险因素,基于此构建的列线图模型在预测RVO性ME患者的复发风险上具有较高的区分度和一致性。

关键词:视网膜静脉阻塞;黄斑水肿;复发;列线图模型;个体化预测

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.2.20

Construction of a individualized model for predicting the risk of recurrence in patients with retinal vein occlusion induced macular edema

Fan Jun, Zhou Meichi, Wei Mu

Department of Ophthalmology, Liuzhou Red Cross Hospital, Liuzhou 545001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Fan Jun. Department of Ophthalmology, Liuzhou Red Cross Hospital, Liuzhou 545001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. 314696912@qq.com

Received:2023-10-05 Accepted:2024-01-04

Abstract

• **AIM:** To analyze the recurrence factors of patients with retinal vein occlusion (RVO) induced macular edema (ME) and construct a nomogram model.

• **METHODS:** Retrospective study. A total of 306 patients with RVO induced ME admitted to our hospital from January 2019 to June 2022 were included as study objects, and they were divided into modeling group with 214 cases (214 eyes) and 92 cases (92 eyes) in the verification group by 7:3. All patients were followed up for 1 a after receiving anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) treatment, and patients in the modeling group were separated into a recurrence group ($n=66$) and a non recurrence group ($n=148$) based on whether they had recurrence. Clinical data were collected and multivariate Logistic regression was applied to analyze and determine the factors affecting recurrence in patients with RVO induced ME; R3.6.3 software was applied to construct a nomogram model for predicting the recurrence risk of patients with RVO induced ME; ROC curve and calibration curve were applied to evaluate the discrimination and consistency of nomogram model in predicting the recurrence risk of patients with RVO induced ME.

• **RESULTS:** There were statistically significant differences in central retinal thickness (CRT), course of disease, hyperreflective foci (HF), disorder of retinal inner layer structure, and injection frequency between the non recurrence group and the recurrence group before treatment (all $P < 0.05$). The multivariate Logistic regression analysis showed that pre-treatment CRT ($OR=1.011$), course of disease ($OR=1.104$), HF ($OR=5.074$), retinal inner layer structural disorder ($OR=4.640$), and injection frequency ($OR=4.036$) were influencing factors for recurrence in patients with RVO induced ME (all $P <$

0.01)。The area under the ROC curve of the modeling group was 0.924 (95% CI: 0.882–0.966), the slope of the calibration curve was close to 1, and the results of the Hosmer–Lemeshow goodness of fit test showed that $\chi^2 = 11.817$, $P = 0.160$; the area under the ROC curve of the verification group was 0.939 (95% CI: 0.892–0.985), the slope of the calibration curve was close to 1, and the results of the Hosmer–Lemeshow goodness of fit test showed $\chi^2 = 6.082$, $P = 0.638$ 。

• **CONCLUSION:** Pre-treatment CRT, course of disease, HF, disorder of retinal inner layer structure, and injection frequency are independent risk factors for recurrence in patients with RVO induced ME. The nomogram model constructed based on this has a high discrimination and consistency in predicting the recurrence risk of patients with RVO induced ME.

• **KEYWORDS:** retinal vein occlusion; macular edema; recurrence; nomogram model; individualized prediction

Citation: Fan J, Zhou MC, Wei M. Construction of a individualized model for predicting the risk of recurrence in patients with retinal vein occlusion induced macular edema. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024,24(2):284–288.

0 引言

视网膜静脉阻塞 (retinal vein occlusion, RVO) 是指视网膜静脉系统发生血栓,可发生于中央静脉、分支静脉和半侧中央静脉,病因复杂,与高血压、高血脂、动脉硬化和血液黏度高等多种因素有关^[1-2]。RVO 病变表现为视网膜出血、水肿,易发生黄斑水肿 (macular edema, ME) 和新生血管等并发症,导致视力下降、视野缺损、视物变形^[3-4]。玻璃体内注射抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 药物是治疗 ME 的有效方法,但临床观察发现,部分 RVO 性 ME 患者经过抗 VEGF 治疗后仍会复发,需要反复注射抗 VEGF 药物^[5-6]。目前, RVO 性 ME 患者复发的机制不明,临床上也缺少能够预测 RVO 性 ME 患者复发风险的模型^[7]。因此,本研究通过收集 306 例 RVO 性 ME 患者临床资料,分析影响 RVO 性 ME 患者复发的危险因素并构建预测 RVO 性 ME 患者复发风险的列线图模型,为临床上进行个体化预测提供帮助,报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象 回顾性研究。纳入本院 2019–01/2022–06 期间收治的 RVO 性 ME 患者 306 例为研究对象,按 7:3 分为建模组 214 例 214 眼和验证组 92 例 92 眼。纳入标准:(1)首次发病;(2)光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 显示黄斑中心凹视网膜厚度 (center retinal thickness, CRT) >300 μm ;(3)接受抗 VEGF 治疗;(4)单眼发病。排除标准:(1)随访时间不足 1a;(2)临床资料不全;(3)眼部外伤史;(4)依从性差;(5)合并青光眼、白内障、视网膜脱离等眼部疾病;(6)其它原因导致 ME;(7)首次接受抗 VEGF 治疗;(8)治疗后未达到消退标准。本研究经本院医学伦理委员会审核通过。所有患者均知情同意。

1.2 方法 所有患者均进行玻璃体抗 VEGF 治疗,采用 3+PRN 原则 (前 3 mo 每月注射 1 次,第 4 mo 起根据患者

具体情况决定是否继续治疗)。治疗前后进行 OCT 检查,以黄斑中心凹 1 mm 区域内进行扫描,记录 CRT,同时观察高反射灶 (hyperreflective foci, HF) (有/无)、视网膜内层结构紊乱 (是/否)、外界膜 (完整/不完整)、内丛状层 (完整/不完整)、视网膜下液 (有/无)。其它资料包括年龄、性别、患眼眼别 (左/右)、病程 (从出现 ME 到第一次进行抗 VEGF 治疗的时间)、阻塞类型 (视网膜中央/分支静脉阻塞)、注药次数 (≤ 3 次/ >3 次)、注药后激光史 (有/无)、高血压 (有/无)、糖尿病 (有/无)、高脂血症 (有/无)。

疗效标准:治疗后 CRT 较治疗前下降 10% 及以上或 CRT <300 μm , 无残留视网膜内囊腔或视网膜下液为消退;消退后再次出现 CRT >300 μm 或 CRT <300 μm , 出现新视网膜内囊腔或视网膜下液为复发。

统计学分析:采用 SPSS 25.0 分析数据。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行独立样本 t 检验;计数资料用 $n(\%)$ 表示,行 χ^2 检验。多因素 Logistic 回归分析 (逐步向前法筛选自变量) 确定 RVO 性 ME 患者复发的影响因素;R3.6.3 软件构建预测 RVO 性 ME 患者复发风险的列线图模型;ROC 曲线和校准曲线评估列线图模型预测 RVO 性 ME 患者复发风险的区分度和一致性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建模组和验证组临床资料比较 本研究共纳入 RVO 性 ME 患者 306 例 306 眼,按 7:3 分为建模组 214 例 214 眼和验证组 92 例 92 眼。建模组和验证组临床资料比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

2.2 建模组患者复发的单因素分析 建模组 214 眼中 66 眼抗 VEGF 治疗后 1a 内出现复发,复发率 30.8%。单因素分析结果显示,未复发组和复发组患者治疗前 CRT、病程、HF、视网膜内层结构紊乱、注药次数方面比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

2.3 建模组患者复发的多因素 Logistic 回归分析 将表 2 差异有统计学意义的因素作为自变量进行多因素 Logistic 回归分析 (逐步向前法筛选自变量),结果显示,治疗前 CRT ($OR = 1.011$)、病程 ($OR = 1.104$)、HF ($OR = 5.074$)、视网膜内层结构紊乱 ($OR = 4.640$)、注药次数 ($OR = 4.036$) 是 RVO 性 ME 患者复发的影响因素 ($P < 0.01$),见表 3。

2.4 预测 RVO 性 ME 患者复发风险的列线图模型 基于治疗前 CRT、病程、HF、视网膜内层结构紊乱、注药次数五个危险因素构建预测 RVO 性 ME 患者复发风险的列线图模型。结果显示,治疗前 CRT 每增加 100 μm 增加 11 分权重,病程每增加 10 d 增加 10 分权重,HF 增加 16 分权重,视网膜内层结构紊乱增加 15 分权重,注药次数 >3 次增加 14 分的权重。若某 RVO 性 ME 患者上述影响因素总得分为 124 分,则复发概率为 70%,若总得分为 138,复发概率为 90%,见图 1。

2.5 建模组 ROC 曲线和校准曲线 建模组 ROC 曲线下面积为 0.924 (95% CI: 0.882–0.966),校准曲线斜率接近 1, Hosmer–Lemeshow 拟合优度检验结果显示 $\chi^2 = 11.817$, $P = 0.160$,见图 2、3。

2.6 验证组 ROC 曲线和校准曲线 验证组 ROC 曲线下面积为 0.939 (95% CI: 0.892–0.985),校准曲线斜率接近 1, Hosmer–Lemeshow 拟合优度检验结果显示 $\chi^2 = 6.082$, $P = 0.638$,见图 4、5。

表1 建模组和验证组临床资料比较

指标		建模组 (n=214)	验证组 (n=92)	t/χ^2	P
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)		61.97±8.78	63.15±9.16	1.064	0.288
治疗前 CRT ($\bar{x} \pm s$, μm)		592.63±115.03	608.52±121.34	1.090	0.277
病程 ($\bar{x} \pm s$, d)		72.96±14.25	70.85±13.71	1.201	0.231
性别 (例, %)	男	117 (54.7)	52 (56.5)	0.089	0.766
患眼眼别 (眼, %)	左	93 (43.5)	37 (40.2)	0.277	0.599
阻塞类型 (眼, %)	中央静脉阻塞	65 (30.4)	33 (35.9)	0.893	0.345
	分支静脉阻塞	149 (69.6)	59 (64.1)		
HF (眼, %)	有	115 (53.7)	43 (46.7)	1.262	0.261
视网膜内层结构紊乱 (眼, %)	是	164 (76.6)	63 (68.5)	2.235	0.135
视网膜下液 (眼, %)	有	119 (55.6)	54 (58.7)	0.250	0.617
外界膜 (眼, %)	完整	57 (26.6)	28 (30.4)	0.463	0.496
	不完整	157 (73.4)	64 (69.6)		
内丛状层 (眼, %)	完整	78 (36.5)	31 (33.7)	0.213	0.645
	不完整	136 (63.6)	61 (66.3)		
注药次数 (眼, %)	>3 次	86 (40.2)	35 (38.0)	0.124	0.725
	≤3 次	128 (59.8)	57 (62.0)		
注药后激光史 (眼, %)	有	43 (20.1)	16 (17.4)	0.302	0.583
高血压 (例, %)	有	96 (44.9)	39 (42.4)	0.159	0.690
糖尿病 (例, %)	有	19 (8.9)	12 (13.0)	1.226	0.268
高脂血症 (例, %)	有	42 (19.6)	22 (23.9)	0.715	0.398

表2 建模组患者复发的单因素分析

指标		未复发组 (n=148)	复发组 (n=66)	t/χ^2	P
年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)		61.27±8.65	63.55±9.07	1.754	0.081
治疗前 CRT ($\bar{x} \pm s$, μm)		552.27±106.34	683.14±134.52	7.641	<0.01
病程 ($\bar{x} \pm s$, d)		68.41±13.18	83.17±16.65	6.957	<0.01
性别 (例, %)	男	83 (56.1)	34 (51.5)	0.384	0.535
患眼眼别 (眼, %)	左	63 (42.6)	30 (45.5)	0.155	0.694
阻塞类型 (眼, %)	中央静脉阻塞	41 (27.7)	24 (36.4)	1.619	0.203
	分支静脉阻塞	107 (72.3)	42 (63.6)		
HF (眼, %)	有	67 (45.3)	48 (72.7)	13.842	<0.01
视网膜内层结构紊乱 (眼, %)	是	101 (68.2)	63 (95.5)	18.876	<0.01
视网膜下液 (眼, %)	有	80 (54.1)	39 (59.1)	0.469	0.493
外界膜 (眼, %)	完整	43 (29.1)	14 (21.2)	1.436	0.231
	不完整	105 (71.0)	52 (78.8)		
内丛状层 (眼, %)	完整	58 (39.2)	20 (30.3)	1.556	0.212
	不完整	90 (60.8)	46 (69.7)		
注药次数 (眼, %)	>3 次	49 (33.1)	37 (56.1)	10.004	<0.01
	≤3 次	99 (66.9)	29 (43.9)		
注药后激光史 (眼, %)	有	25 (16.9)	18 (27.3)	3.064	0.080
高血压 (例, %)	有	67 (41.2)	29 (51.5)	1.961	0.161
糖尿病 (例, %)	有	11 (7.4)	8 (12.1)	1.240	0.265
高脂血症 (例, %)	有	25 (16.9)	17 (25.8)	2.274	0.132

表3 建模组患者复发的多因素 Logistic 回归分析

变量	β	SE	Wald χ^2	P	OR	95% CI
治疗前 CRT	0.011	0.002	22.520	<0.01	1.011	1.006-1.015
病程	0.099	0.020	24.097	<0.01	1.104	1.061-1.149
HF	1.624	0.500	10.544	<0.01	5.074	1.904-13.524
视网膜内层结构紊乱	1.535	0.621	6.113	0.013	4.640	1.375-15.666
注药次数	1.395	0.463	9.064	<0.01	4.036	1.627-10.008
常量	-18.148	2.679	45.885	<0.01	0.000	-

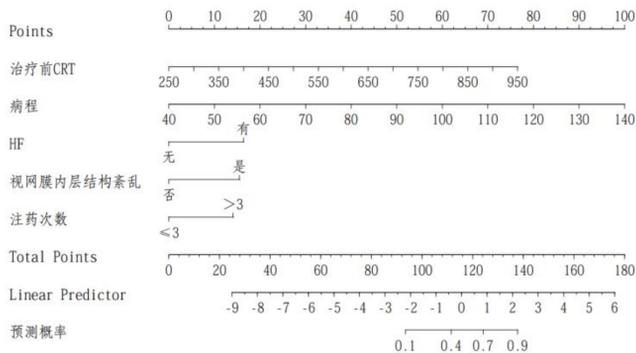


图1 预测RVO性ME患者复发风险的列线图模型。

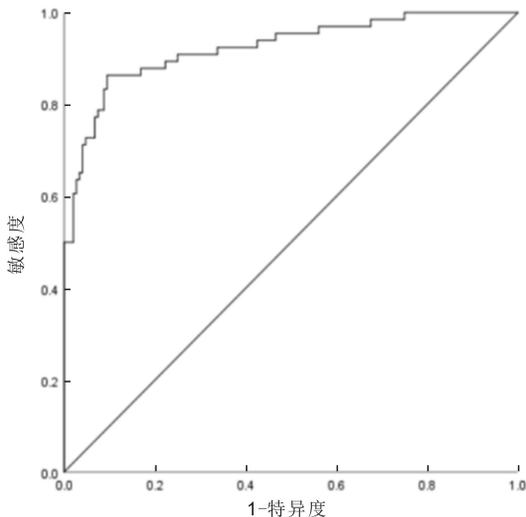


图2 建模组ROC曲线。

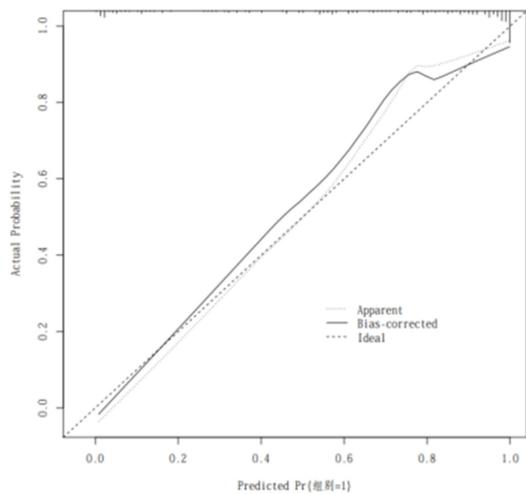


图3 建模组校准曲线。

3 讨论

RVO是仅次于糖尿病视网膜病变的视网膜血管疾病,发病率约为0.6% - 1.6%,以老年人为主要发病人群^[8]。黄斑区是视网膜上对光线为敏感的部位,ME是造成RVO视力下降的主要原因之一^[9]。RVO性ME容易复发,增加患者治疗负担的同时,也不利于患者眼部健康,在患者治疗前或治疗初期进行复发风险评估,对实施个体化治疗、预防复发非常重要^[10]。

本研究发现,复发组患者治疗前CRT和病程显著高于未复发组,且复发组中具有HF、发生视网膜内层结构紊乱及注药次数>3次的患者占比明显高于未复发组,提示RVO性ME患者的复发与治疗前CRT、病程、HF、视网膜

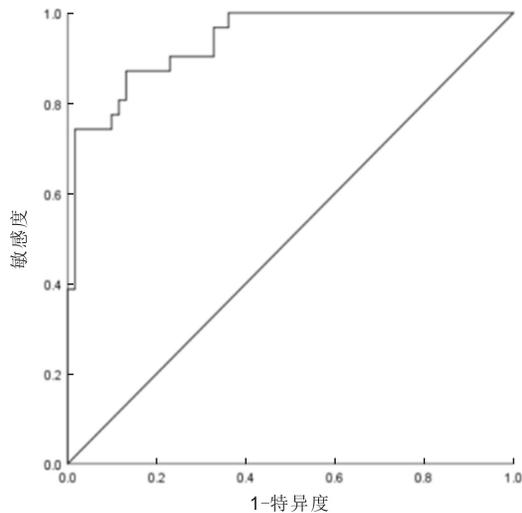


图4 验证组ROC曲线。

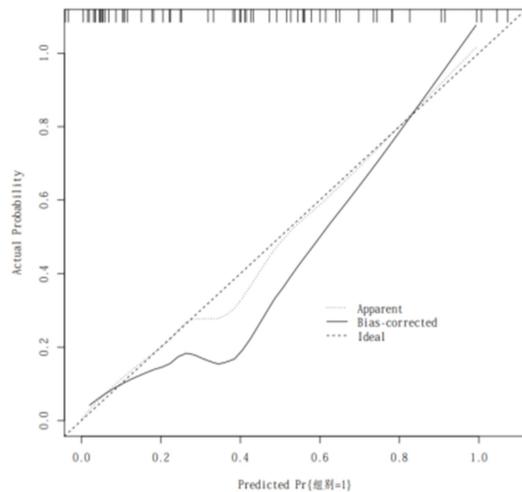


图5 验证组校准曲线。

内层结构紊乱、注药次数有关。本研究进行的多因素Logistic回归分析也表明治疗前CRT、病程、HF、视网膜内层结构紊乱、注药次数是RVO性ME患者复发的影响因素。梁雁雁等^[11]报道,CRT、HF和高血压是不仅是影响RVO性ME患者注射抗VEGF药物次数的影响因素,对RVO性ME患者复发也有一定预测价值。尹小芳等^[12]的研究认为,年龄和治疗前CRT为影响视网膜分支静脉阻塞性ME患者抗VEGF治疗后复发的影响因素。本研究多因素分析结果与上述研究有相似之处,也有不同之处,有待后续验证。

本研究进一步构建预测RVO性ME患者复发风险的列线图模型,以便帮助临床上进行个体化预测。列线图中包含治疗前CRT、病程、HF、视网膜内层结构紊乱和注药次数五项影响因素,可根据患者图中影响因素总得分,获得复发概率。临床上可以根据患者复发风险优化治疗方案,提高预后。CRT与视功能关系紧密,临床上常用CRT评价疾病进展和治疗反应情况^[13]。邓玉梦等^[14]报道,RVO性ME患者经过抗VEGF治疗后CRT较治疗前下降。列线图结果显示,患者治疗前CRT在250 μm基础上每增加100 μm增加11分权重。李真平等^[15]根据研究结果推测,RVO患者于第2 mo进行抗VEGF治疗效果较好,能够有效抑制病情进展,降低复发率,表明后期复发情况受病程影响。本研究结果也显示,病程越长复发几率越

高。视网膜内层结构紊乱与血流异常有关,视网膜内层结构紊乱区域有可能持续缺氧,导致 VEGF 过表达,因此容易复发 ME^[16]。研究报道, HF 的发生反映视网膜的炎症反应, HF 的数量也与治疗反应有关^[17]。列线图显示视网膜内层结构紊乱及 HF 分别增加 15 分和 16 分的权重。有研究报道^[11], 复发组患者抗 VEGF 药物注射次数显著高于未复发组 RVO 性 ME 患者。本研究结果也提示注药次数>3 次的患者, ME 复发的概率更高。

为评估该列线图预测 RVO 性 ME 患者复发风险的准确性, 本研究除进行内部验证外, 同时设置验证组进行外部验证, 结果显示, 建模组和验证组 ROC 曲线下面积分别为 0.924 和 0.939, 提示区分度较好, Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验结果也提示预测概率与真实概率无明显差异, 模型拟合度较佳。

综上所述, 治疗前 CRT、病程、HF、视网膜内层结构紊乱、注药次数是 RVO 性 ME 患者复发的影响因素, 基于此构建的列线图模型在预测 RVO 性 ME 患者的复发风险上具有较高的区分度和一致性, 有助于临床进行个体化预测。但本研究构建的列线图模型预测 RVO 性 ME 患者的复发风险的准确性有待大样本、多中心研究进行验证。

参考文献

- [1] Pinna A, Zinellu A, Serra R, et al. Combined branch retinal artery and central retinal vein occlusion; a systematic review. *Vision*, 2023, 7(3):51.
- [2] Gerber MJ, Hubschman JP, Tsao TC. Automated retinal vein cannulation on silicone phantoms using optical-coherence-tomography-guided robotic manipulations. *IEEE ASME Trans Mechatron*, 2021, 26(5):2758-2769.
- [3] Chen XW, Wang MY, Tang Y, et al. Von Hippel-Lindau disease complicated with central retinal vein occlusion; a case report. *BMC Ophthalmol*, 2022, 22(1):440.
- [4] Gallardo M, Munk MR, Kurmann T, et al. Machine learning can predict anti-VEGF treatment demand in a treat-and-extend regimen for patients with neovascular AMD, DME, and RVO associated macular edema. *Ophthalmol Retina*, 2021, 5(7):604-624.
- [5] Damasceno NA, Yannuzzi NA, Maia M, et al. Transient central retina artery occlusion in patients undergoing intravitreal anti vegf injections. *Eur J Ophthalmol*, 2022, 32(5):2819-2823.
- [6] Scott IU, Oden NL, VanVeldhuisen PC, et al. Baseline characteristics and outcomes after anti-vascular endothelial growth factor

therapy for macular edema in participants with hemiretinal vein occlusion compared with participants with central retinal vein occlusion; study of comparative treatments for retinal vein occlusion 2 (SCORE2) report 18. *JAMA Ophthalmol*, 2022, 140(5):458-464.

[7] Ciulla TA, Kapik B, Hu A, et al. Anatomic biomarkers of macular edema associated with retinal vein occlusion. *Ophthalmol Retina*, 2022, 6(12):1206-1220.

[8] Trovato Battagliola E, Pacella F, Malvasi M, et al. Risk factors in central retinal vein occlusion; a multi-center case-control study conducted on the Italian population; demographic, environmental, systemic, and ocular factors that increase the risk for major thrombotic events in the retinal venous system. *Eur J Ophthalmol*, 2022, 32(5):2801-2809.

[9] 王娟, 李东, 胡倩, 等. 老年视网膜静脉阻塞性黄斑水肿患者抗 VEGF 治疗预后的相关因素. *中国老年学杂志*, 2023, 43(12):2940-2942.

[10] Aref AA, Scott IU, VanVeldhuisen PC, et al. Intraocular pressure-related events after anti-vascular endothelial growth factor therapy for macular edema due to central retinal vein occlusion or hemiretinal vein occlusion; SCORE2 report 16 on a secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol*, 2021, 139(12):1285-1291.

[11] 梁雁雁, 樊芳, 贾志喆. 玻璃体内注射雷珠单抗后视网膜静脉阻塞性黄斑水肿复发的预测因素分析. *眼科新进展*, 2022, 42(10):802-805.

[12] 尹小芳, 叶祖科, 汤秀容, 等. 玻璃体内注射雷珠单抗后视网膜分支静脉阻塞性黄斑水肿复发的危险因素分析. *眼科新进展*, 2020, 40(1):46-49.

[13] Kaiser PK, Wyckoff CC, Singh RP, et al. Retinal fluid and thickness as measures of disease activity in neovascular age-related macular degeneration. *Retina*, 2021, 41(8):1579-1586.

[14] 邓玉梦, 宋艳萍, 黄珍, 等. 年龄和 OCT 特征与抗 VEGF 治疗视网膜中央静脉阻塞性黄斑水肿效果的相关性. *国际眼科杂志*, 2021, 21(6):1062-1067.

[15] 李真平, 宋爽, 张鹏, 等. 视网膜分支静脉阻塞继发黄斑水肿抗 VEGF 治疗后复发的相关因素分析. *临床眼科杂志*, 2022, 30(6):491-496.

[16] Costa JV, Moura-Coelho N, Abreu AC, et al. Macular edema secondary to retinal vein occlusion in a real-life setting; a multicenter, nationwide, 3-year follow-up study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2021, 259(2):343-350.

[17] 梁雁雁, 樊芳, 贾志喆. 视网膜静脉阻塞性黄斑水肿复发因素的研究进展. *眼科新进展*, 2022, 42(7):585-588.