

# Клиническое значение некоторых иммуногистохимических маркеров при немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря

К.Н. Сафиуллин, Н.А. Горбань, О.Б. Карякин, В.В. Пугачев

ГУ МРНЦ РАМН, Обнинск

Контакты: Нина Андреевна Горбань [perovanina@mail.ru](mailto:perovanina@mail.ru)

Проведена оценка прогностического значения экспрессии онкопротеина *c-erbB-2* и *p53*-протеина, цитокератина 20 (CK20) и Ki-67 при папиллярном уротелиальном немышечно-инвазивном раке мочевого пузыря (РМП). Исследован биопсийный и операционный материал, полученный от 57 пациентов (46 мужчины и 11 женщин) в возрасте от 24 до 75 лет (средний возраст  $56 \pm 1,5$  года), проходивших комбинированное лечение по поводу немышечно-инвазивного РМП. Установлено, что *c-erbB-2* и *p53* являются значимыми прогностическими маркерами для мышечно-неинвазивного РМП. Высокой статистической значимостью обладает коэкспрессия 3 маркеров.

**Ключевые слова:** немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря, иммуногистохимическое исследование, прогностические маркеры

## Clinical significance of some immunohistochemical markers in non-muscle-invasive bladder carcinoma

K.N. Safullin, N.A. Gorban, O.B. Karyakin, V.V. Pugachev

Medical Radiology Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Obninsk

The prognostic value of the expression of *c-erbB-2* oncoprotein, *p53* protein, cytokeratin 20, and Ki-67 was estimated in papillary urothelial non-muscle-invasive bladder carcinoma (BC). The biopsy and surgery samples from 57 patients (46 males and 11 females) aged 24 to 75 years (mean age  $56 \pm 1.5$  years), who received combination treatment for non-muscle-invasive BC, were examined. It has been found that *c-erbB-2* and *p53* are important prognostic markers of non-muscle-invasive BC. Co-expression of 3 markers is of high statistic significance.

**Key words:** non-muscle-invasive bladder carcinoma, immunohistochemical markers, prognostic markers

### Введение

Среди всех злокачественных новообразований на долю рака мочевого пузыря (РМП) в России приходится 2,8%. Заболеваемость РМП постоянно увеличивается: за последние 10 лет прирост составил 15,89% при среднегодовом его темпе 1,49% [1]. На момент установления диагноза у 70–85% больных выявляется немышечно-инвазивный РМП – Tis, Ta, T1 [2]. Более 90% случаев РМП составляет переходноклеточный рак.

Своевременное правильное определение глубины прорастания и градации опухоли является основополагающим моментом в выборе современной тактики лечения больных немышечно-инвазивным РМП. Наиболее распространенным методом лечения пациентов, имеющих стадии Ta–T1, является трансуретральная резекция (ТУР) опухоли. Однако в течение 1 года наблюдения, по данным различных авторов, у 30–90% больных развивается рецидив заболевания [3, 4].

При комбинированном анализе клинических исследований Европейской организации по исследова-

нию и лечению рака (EORTC) было установлено, что вероятность возникновения рецидива и прогрессирования через 1 год после выполнения ТУР колебалась от 15 до 61 и от < 1 до 17% соответственно, а через 5 лет – от 31 до 78 и от < 1 до 45%. Однако при наличии стадии T1G3 и сопутствующей карциномы *in situ* (CIS) прогрессирование заболевания через 1 год зарегистрировано у 29%, а через 5 лет – у 74% больных [5]. EORTC разработала систему баллов и таблицы риска отдельно для краткосрочного и долгосрочного прогнозирования рецидивирования и прогрессирования немышечно-инвазивного РМП у каждого конкретного пациента [5]. Данная система основывается на 6 наиболее значимых клинических и морфологических признаках: число опухолей; размер опухоли; частота возникновения предшествующего рецидива; T-критерий; наличие сопутствующей CIS; дифференцировка опухоли. Тем не менее вопрос о диагностике в прогнозировании рецидива немышечно-инвазивного РМП остается открытым и окончательного решения этой проблемы пока не найдено. При наличии общепринятого стандарта

обследования продолжается постоянный поиск новых методов, позволяющих прогнозировать развитие рецидива и прогрессирование немышечно-инвазивного РМП. В настоящее время проводятся интенсивные исследования молекулярно-биологических тканевых маркеров, имеющих прогностическое значение при РМП.

В основе образования опухоли лежит избыточное размножение определенных клеток. В связи с этим совершенно естественным является то, что в последние годы большое значение в онкологии придают роли пролиферации в опухоли. Наиболее популярным маркером, используемым при изучении пролиферативной активности, служит антиген *Ki-67*. Присутствие его во всех фазах митотического цикла позволяет применять данный белок в качестве универсального маркера пролиферации при оценке активности роста злокачественных новообразований [6].

Ген *p53* — хорошо известный опухолевый супрессор, который играет ключевую роль при повреждении клетки, вызывая остановку клеточного деления в сверхточных точках клеточного цикла, где клетки имеют возможность исправить возникшие повреждения либо полностью выключаются из дальнейших делений, подвергаясь клеточной смерти по типу апоптоза или клеточному старению, приводящему к смерти по типу некроза [7]. Мутации гена *p53* обнаруживают в 50–60% новообразований более чем 50 различных типов опухолей [8].

Продукт онкогена *Her-2* — трансмембранный онкопротеин *c-erbB-2* является членом семейства рецепторов эпидермального фактора роста, локализующимся на клеточной мембране и действующим посредством образования димеров с другими молекулами *Her-2* или *Her-1*, *Her-3*, *Her-4*. Его определяют иммуногистохимическим (ИГХ) методом и часто выявляют при РМП [9]. Сверхэкспрессия *Her-2* в РМП коррелирует с высокой степенью злокачественности, специфической выживаемостью, развитием метастазов и плохим прогнозом.

В нормальном уротелии цитокератин 20 (СК 20) экспрессируется зонтичными клетками. Экспрессию СК 20

полным слоем уротелия или отсутствие экспрессии отмечают при рецидивах уротелиального рака [10].

Данные о различных маркерах остаются противоречивыми, и до настоящего времени нет единого протокола оценки ИГХ-маркеров, что порой затрудняет трактовку полученных результатов.

**Цель исследования** — оценка прогностического значения экспрессии *Ki-67*, *p53*, онкопротеина *c-erbB-2* и СК 20 в уротелиальном РМП Та–Т1.

#### Материалы и методы

Исследован материал, полученный после выполнения ТУР мочевого пузыря от 57 пациентов (46 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 24 до 75 лет (средний возраст  $56 \pm 1,5$  года) с немышечно-инвазивным уротелиальным РМП, относящихся к группе промежуточного и неблагоприятного прогноза по бальной системе EORTC. Все больные проходили лечение в клинике МРНЦ РАМН в период с 1998 по 2008 г. (сроки наблюдения — от 1 до 7 лет после операции). Гистологические срезы опухолевой ткани окрашивали гематоксилин-эозином и использовали для проведения ИГХ-исследования. Блокирование эндогенной пероксидазы осуществляли охлажденной 3% перекисью водорода в течение 10 мин. С целью восстановления антигенной структуры клеток фиксированного в формалине и заключенного в парафин материала использовали прогревание гистологических срезов в водяной бане в течение 20 мин в 0,01 М цитратном буферном растворе (рН 6,0). Инкубацию с первичными антителами к *Ki-67*, *p53* и СК 20 проводили при комнатной температуре в течение 60 мин, к онкопротеину *c-erbB-2* — на протяжении 30 мин (табл. 1).

Для осуществления визуализации продуктов иммунной реакции была использована полимерная система EnVision («Dako»), в качестве хромогенного субстрата применяли раствор диаминобензидина («Dako», Liquid DAB+), ядра докрашивали гематоксилином. Для проведения негативного контроля использовали срезы, на которые наносили лишь вто-

Таблица 1. Характеристика ИГХ-маркеров

Показатель	Маркер (клон)			
	Ki-67 (MIB-1)	p53 (DO-7)	c-erbB-2 (поликлон)	СК 20 (Q2)
Позитивный контроль	Миндалина	Рак гортани	Рак молочной железы, мультиблок из 4 опухолей	Нормальный уротелий
Производитель	«DakoCytomation»	«DakoCytomation»	«DakoCytomation»	«DBS»
Рабочее разведение	1:100	1:100	1:400	1:100
Время инкубации, мин	60	60	30	60

ричные антитела без предварительного нанесения первичных.

Оценку степени дифференцировки опухоли и определение стадии опухолевого процесса осуществляли согласно рекомендациям ВОЗ (2004). Положительной экспрессией белка Ki-67 считали наличие специфического окрашивания в коричневый цвет ядер опухолевых клеток (индекс Ki-67 – число позитивно окрашенных опухолевых клеток, выраженное в процентах), p53 – специфического ядерного окрашивания > 25% опухолевых клеток. Позитивной реакцией с антителами к СК 20 считали как диффузное, так и очаговое цитоплазматическое окрашивание более половины толщи пласта уротелиальных опухолевых клеток. Экспрессию онкопротеина c-erbB-2 оценивали согласно рекомендациям, принятым для рака молочной железы. Позитивной реакцией считали экспрессию +3 и +2.

Индекс Ki-67 и экспрессию p53, СК 20 и c-erbB-2 сравнивали с клинико-морфологическими параметрами (Т-стадия, степень дифференцировки опухоли и сроки появления рецидива) с использованием дисперсионного анализа, t-теста Стьюдента, таблиц сопряженности 2×2 ( $\chi^2$ , точный критерий

Таблица 2. ИГХ-экспрессия маркеров и клинико-морфологические параметры

Показатель	Число больных (%)
Возраст, годы:	
<56	26 (45,6)
>56	31 (54,4)
Пол:	
мужской	46 (80,7)
женский	11 (19,3)
Степень дифференцировки:	
низкая	42 (73,7)
высокая	15 (26,3)
Стадия:	
Ta	42 (73,7)
T1	15 (26,3)
Рецидив опухоли:	
есть	35 (61,4)
нет	22 (38,6)
Ki-67, %:	
< 50	48 (84,2)
> 50	9 (15,8)
P53:	
негативный	40 (70,2)
позитивный	17 (29,8)
C-erbB-2:	
негативный	25 (49)
позитивный	26 (51)
СК 20:	
негативный	28 (49,1)
позитивный	29 (50,9)
Коекспрессия 3 маркеров:	
есть	17 (29,8)
нет	40 (70,2)

Фишера). Анализ выживаемости проводили по методу Каплана–Майера (1958), достоверность различий между кривыми выживаемости подтверждали с помощью F-теста Кокса. Значимым принимали уровень  $p \leq 0,05$ . Статистическую обработку полученных параметров осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0.

На момент исследования Та стадия была у 42 пациентов, T1 – у 15. В 42 случаях имел место уротелиальный рак низкой, в 15 – высокой степени злокачественности. Развитие рецидива заболевания зарегистрировано у 35 больных в сроки от 3 до 48 мес (табл. 2).

**Результаты**

Во всех случаях выявлены Ki-67-позитивные клетки, минимальное число которых составило 2%, максимальное – 90%. При опухолях низкой степени злокачественности средний уровень Ki-67 составил 13,1%, высокой – 50,7%. Различие статистически достоверно ( $p=0,00000$ ). При стадии Та средний уровень Ki-67 составил 15,1%, а в группе T1 – 45% ( $p=0,000023$ ).

При использовании полуколичественного метода-сравнения групп пациентов, в опухолях которых уровень Ki-67 составляет > и < 50%, различие в средней продолжительности безрецидивного периода в группах было минимальным – 20 и 23,8 мес ( $p=0,55$ ). Однако в группе больных с высокой пролиферативной активностью опухолей 11-месячная безрецидивная выживаемость (БРВ) оказалась значительно ниже – 44,4% против 74,7%. У 5 из 8 пациентов в течение 1 года и еще у 1 – к концу второго года зафиксировано развитие рецидива заболевания (рис. 1).

Позитивная реакция ядер опухолевых клеток с антителами к p53 обнаружена в 17 (29,8%) случаях. Установлено наличие высокой статистически значимой связи между экспрессией p53 и Т-стадией, степе-

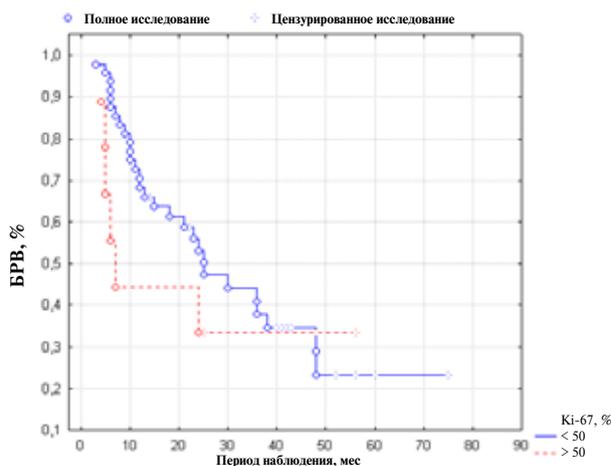


Рис. 1. БРВ по методу Каплана–Майера в зависимости от уровня Ki-67

нию злокачественности ( $p=0,0049$ ) и развитием рецидива заболевания ( $p=0,009$ ). БРВ в группе пациентов с экспрессией  $p53$  была значительно ниже, чем при  $p53$ -негативных опухолях,  $p=0,002$  (рис. 2).

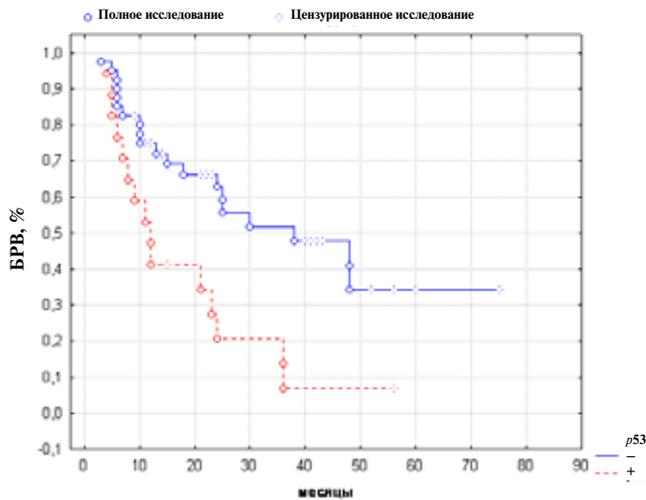


Рис. 2. БРВ по методу Каплана–Майера в зависимости от экспрессии  $p53$

Средняя продолжительность безрецидивного периода в группе  $p53$ -позитивных опухолей была ниже, чем в группе  $p53$ -негативных –  $17,1 \pm 14,3$  и  $25,8 \pm 18,1$  соответственно, однако статистическая достоверность различия сохранялась на уровне тенденции ( $p=0,08$ ).

Патологическая экспрессия СК 20 выявлена в 29 (50,9%) случаях и связана с возникновением рецидива заболевания ( $p=0,002$ ) и низкой БРВ,  $p=0,009$  (рис. 3). Средняя продолжительность безрецидивного периода в группах с экспрессией СК 20 и без экспрессии не различалась (21,6 и 24,9 мес соответственно,  $p=0,49$ ).

Экспрессия онкопротеина  $c-erbB-2$  имела место у 51 пациента, гиперэкспрессия – у 26 ( $c-erbB-2$

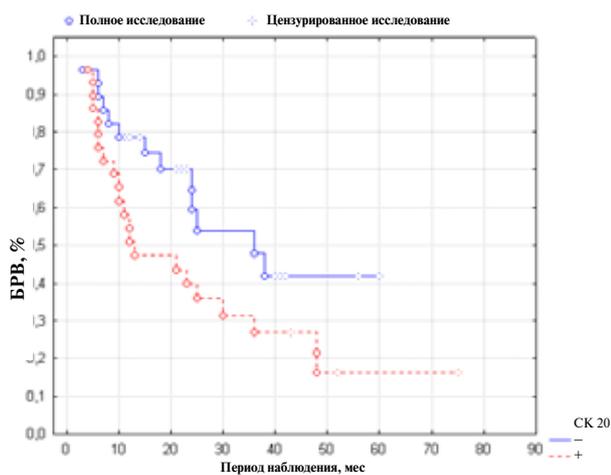


Рис. 3. БРВ по методу Каплана–Майера в зависимости от экспрессии СК 20

+2 и +3). Установлена связь гиперэкспрессии с рецидивом ( $p=0,006$ ) и низкой БРВ,  $p=0,003$  (рис. 4). Средняя продолжительность безрецидивного периода была значительно меньше в группе с  $Her-2$ -позитивными опухолями по сравнению с таковой при  $Her-2$ -негативных новообразованиях: 16,8 и 27,3 мес соответственно ( $p=0,03$ ).

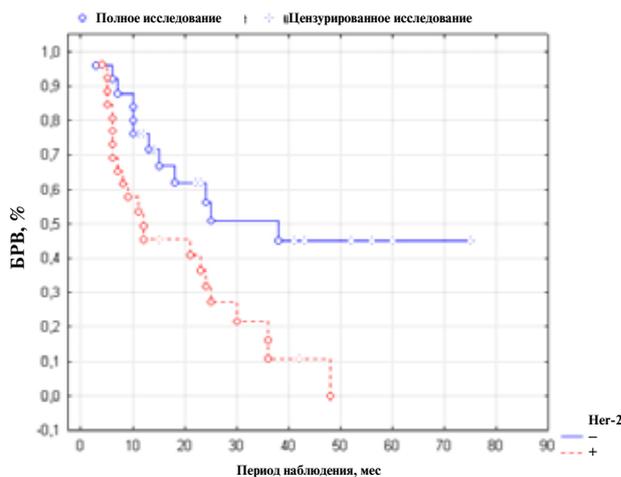


Рис. 4. БРВ по методу Каплана–Майера в зависимости от коэкспрессии онкопротеина  $c-erbB-2$  ( $Her-2/neu$ )

Связи патологической экспрессии СК 20 и гиперэкспрессии онкопротеина  $c-erbB-2$  со стадией процесса и степенью злокачественности опухоли не обнаружено.

У 17 (29,8%) больных наблюдалась коэкспрессия любых 3 маркеров (белок  $p53$ , высокий уровень  $Ki-67$ , СК 20 или онкопротеина  $c-erbB-2$ ), что обусловлено наличием рецидива ( $p=0,006$ ) и низкой БРВ,  $p=0,00058$  (рис. 5). В этой группе пациентов развитие рецидива заболевания зафиксировано в 15 (88,2%) случаях. Средняя продолжительность безрецидивного периода была значительно меньше в группе

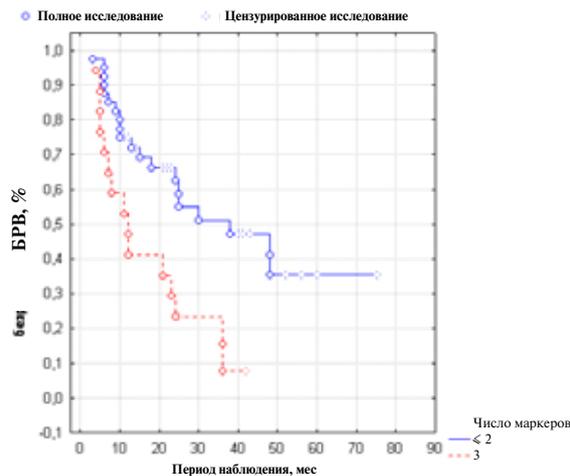


Рис. 5. БРВ по методу Каплана–Майера в зависимости от коэкспрессии маркеров

с экспрессией 3 маркеров: 14,5 и 26,9 мес соответственно ( $p=0,01$ ).

Отсутствие патологической или гиперэкспрессии всех перечисленных маркеров зарегистрировано у 17 (29,8%) пациентов. В данной группе больных возникновение рецидива наблюдалось в 8 (47%) случаях.

### Обсуждение

*Ki-67* рассматривается в литературе как прогностический маркер для БРВ, прогрессии и высокой степени злокачественности при РМП Та и Т1 [10–12]. В нашей работе высокий уровень *Ki-67* также коррелирует с высокой степенью злокачественности и стадией процесса: при опухолях высокой степени злокачественности и стадии Т1 пролиферативный индекс, определяемый с помощью *Ki-67*, значительно выше. Полученные нами данные согласуются с выводами большинства исследователей, которые также отмечают наличие корреляции *Ki-67* со стадией и степенью злокачественности [11, 12]. Так, некоторые авторы предлагают использовать этот маркер при разграничении опухолей высокой, низкой степени злокачественности и уротелиальной опухоли низкого злокачественного потенциала [13, 14]. Более чем у половины (65,6%) пациентов с высоким уровнем *Ki-67* возник рецидив заболевания в течение первого года после выполнения ТУР мочевого пузыря в отличие от группы с низким уровнем данного маркера (25,3% больных). Однако в дальнейшем статистически достоверной разницы между группами с высоким и низким пролиферативными уровнями не наблюдалось. Таким образом, наличие высокого уровня *Ki-67* сигнализирует о развитии рецидива в ближайшее время.

Патологическая экспрессия СК 20 связана с возникновением рецидива заболевания, что согласуется с данными других исследователей [15]. В нашем исследовании экспрессия СК 20 более чем на половину толщи эпителиального слоя была связана с развитием рецидива и низкой БРВ. Однако мы не выявили четкой связи экспрессии СК 20 со стадией или степенью злокачественности опухоли в отличие от некоторых исследователей, которые предлагают использовать этот маркер для определения градации опухоли [10, 16, 17].

Экспрессия *c-erbB-2* наблюдается более чем в половине случаев, что подтверждено данными литературы [18–20]. При РМП Та–Т1 гиперэкспрессия данного маркера указывает на развитие рецидива опухоли. В работе М. Raica и соавт. [21] гиперэкспрессия *Her-2/neu* в группе больных немышечно-инвазивным РМП, у которых развился рецидив, наблюдалась

в 84,61%, а в группе без рецидива – в 7,14% случаев. В нашем исследовании у 22 из 26 пациентов, опухоли которых экспрессировали *c-erbB-2*, зарегистрировано возникновение рецидива заболевания, хотя мы относили к гиперэкспрессии и те опухоли, которые были оценены как +2. Возможно, при проведении FISH-исследования (FISH – флуоресцентная *in situ* гибридизация) некоторые из них не будут демонстрировать амплификацию гена *Her-2/neu* или гиперплоидию 17-й хромосомы и должны быть отнесены в группу *Her-2*-негативных опухолей.

Так же как и в большинстве опубликованных работ, в нашем исследовании экспрессия *p53* связана со стадией заболевания: значительно чаще она встречается при стадии Т1, чем при Та [19, 22]. Также экспрессия *p53* часто сочетается с высокой степенью злокачественности. При опухолях высокой степени злокачественности и стадии Т1 чаще всего (у 8 пациентов из 12) встречаются *p53*-позитивные новообразования. Некоторые авторы предлагают использовать данный маркер для проведения дифференциальной диагностики между высокой и низкой степенями злокачественности, особенно в сочетании с *Ki-67* и СК 20 [10, 21]. Таким образом, представляется логичным, что экспрессия *p53* является фактором неблагоприятного прогноза, что подтверждают результаты проведенного анализа БРВ и средней продолжительности жизни в этой группе. Наличие экспрессии *p53* свидетельствует о плохом прогнозе заболевания, а при Та–Т1 стадиях – о высоком риске развития рецидива и прогрессии заболевания.

Высокую значимость имеет сочетание любых 3 маркеров. В данной группе пациентов возникновение рецидива зарегистрировано в 88% случаев (у 15 из 17 больных). Вторая группа пациентов является гетерогенной: развитие рецидива заболевания отмечено у 50% больных, в то время как 50% живы без признаков рецидивирования. Следовательно, экспрессия каждого из маркеров имеет неблагоприятное прогностическое значение для прогнозирования возникновения рецидива папиллярного уротелиального рака после выполнения ТУР опухоли, а сочетание экспрессии указанных маркеров характеризуется очень высокой значимостью. Пациентов с опухолями данного иммунофенотипа следует относить к группе высокого риска развития рецидива. В то же время группа больных, опухоли которых имели, казалось бы, «благоприятный» иммунофенотип – не экспрессировали ни одного из маркеров, – оказалась гетерогенной: у 8 из 17 пациентов диагностирован рецидив заболевания.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Чиссов В.И., Старинский В.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2009 г. М., 2010.
2. Русаков И.Г., Соколов В.В., Булгакова Н.Н. и др. Фотодинамическая диагностика и флуоресцентная спектроскопия при поверхностном раке мочевого пузыря. *Онкоурология* 2009;(4):41–6.
3. Карякин О.Б. Комбинированное лечение местно-распространенного и распространенного рака мочевого пузыря. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Обнинск, 1996.
4. Фигурин К.М. Химиотерапия и иммунотерапия рака мочевого пузыря. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 1993.
5. Sylvester R.J., van der Meijden A., Oosterlinck W. et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta–T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006;49(3):466–77.
6. Шацева Т.А., Мухина М.С. Антиген Ki-67 в оценке опухолевой пролиферации. Его структура и функции. *Вопр Онкол* 2004;50(2):157–64.
7. Комарова Е.А., Гудков А.В. Супрессия p53: новый подход к преодолению побочных эффектов противоопухолевой терапии. *Биохимия* 2000;65(1):48–56.
8. Петровичев Н.Н. Основные направления в патологоанатомической диагностике опухолей человека. *Вестн РАМН* 2001;(9):33–8.
9. Nabuchi T., Marberger M., Droller M.J. et al. Prognostic markers for bladder cancer: international consensus panel on bladder tumor markers. *Urology* 2005;(66):64–74.
10. Shim J.W., Cho K.S., Choi Y.D. et al. Diagnostic algorithm for papillary urothelial tumors in the urinary bladder. *Virchows Arch* 2008;452(4):353–62.
11. Burger M., Madelon N.M. van der Aa M.N.M. et al. Prediction of progression of non-muscle-invasive bladder cancer by WHO 1973 and 2004 grading and by FGFR3 mutation status: a prospective study. *Eur Urol* 2008;(54):835–44.
12. Quintero A., Alvares-Kindelan J., Luque R.J. et al. Ki-67 MIB1 labelling index and the prognosis of primary Ta/T1 urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Clin Pathol* 2006;(59):83–8.
13. Comperat E., Camparo P., Haus R. et al. Immunohistochemical expression of p63, p53 and MIB-1 in urinary bladder carcinoma. A tissue microarray study of 158 cases. *Virchows Arch* 2006;448(3):319–24.
14. Yin H., Leong A.S.Y. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial tumors. *Am J Clin Pathol* 2004;121(5):679–87.
15. Harnden P., Allam A., Joyce A.D. et al. Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease. *Histopathology* 1995;27(2):169–74.
16. Yildiz I.Z., Recavarren R., Armah H.B. et al. Utility of a dual immunostain cocktail comprising of p53 and CK20 to aid in the diagnosis of non-neoplastic and neoplastic bladder biopsies. *Diagn Pathol* 2009;4:35.
17. Barbisan F., Santinelli A., Mazzucchelli R. et al. Strong immunohistochemical expression of fibroblast growth factor receptor 3, superficial staining pattern of cytokeratin 20, and low proliferative activity define those papillary urothelial neoplasms of low malignant potential that do not recur. *Cancer* 2008;112(3):636–44.
18. Hauser-Kronberger C., Peham K., Grall J. et al. Novel approach of human epidermal growth factor receptor 2 detection in noninvasive and invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2006;175(3 Pt 1):875–80.
19. Ecke T.H., Schlechte H.H., Schulze G. et al. Four tumour markers for urinary bladder cancer – tissue polypeptide antigen (TPA), Her-2/neu (Erb-B2), urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and TP53 mutation. *Anticancer Res* 2005;25(1):635–41.
20. Kruger S., Lange I., Kausch I. et al. Protein expression and gene copy number analysis of topoisomerase 2-alpha, Her-2 and p53 in minimally invasive urothelial carcinoma of the urinary bladder – a multitissue array study with prognostic implications. *Anticancer Res* 2005;25(1):263–71.
21. Raica M., Zylis D., Cîmpean A.M. Cytokeratin 20, 34-beta-E12 and overexpression of Her-2/neu in urine cytology as predictors of recurrences in superficial urothelial carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2005;46(1):11–5.
22. Dekairelle A.F., Tombal B., Cosyns J.P. et al. Assessment of the transcriptional activity of p53 improves the prediction of recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2005;11(13):4724–32.