

◁ 中枢神经影像学 ▷

基于增强 MRI 全肿瘤影像组学鉴别四脑室室管膜瘤和髓母细胞瘤的应用研究

廖建勇¹, 张洁¹, 高培毅²

(1. 首都医科大学大兴教学医院放射科, 北京 102600; 2. 首都医科大学附属北京天坛医院放射科, 北京 100160)

[摘要] 目的: 探讨基于增强 MRI 影像组学在鉴别四脑室室管膜瘤(EP)和髓母细胞瘤(MB)的应用价值, 并将其结果与人工阅片进行对比分析。方法: 回顾性分析经手术病理证实为四脑室 EP 和 MB 的临床及影像资料, 其中 EP 和 MB 分别为 80 例及 135 例, 并按 7:3 随机划分为训练集(n=150)和测试集(n=65)。基于 T₁WI 增强图像筛选的 18 个影像组学特征和有统计学意义的临床影像特征, 通过逻辑回归分类器分别建立影像组学模型、临床影像特征模型、联合模型。通过曲线下面积(AUC)、决策曲线分析分别评估模型的鉴别效能、实用性。结果: 联合模型诊断效能最佳, 其 AUC 值、灵敏度、特异性、准确率和 F1 分数分别为 0.981、92.68%、91.67%、92.31% 和 0.938。联合模型的诊断效能优于临床影像特征模型($P<0.05$)。联合模型的净收益最高。3 种模型的灵敏度、特异性、准确率和 F1 分数较人工阅片的结果均有不同程度提高。结论: 基于增强 MRI 影像组学对鉴别 EP 和 MB 具有较高的临床应用价值, 特别是联合模型, 有助于提高术前诊断准确率。

[关键词] 室管膜瘤; 髓母细胞瘤; 磁共振成像**[中图分类号]** R739.41; R739.45; R445.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1008-1062(2025)01-0001-05

DOI:10.12117/jccmi.2025.01.001

Clinical study on the differentiation of fourth ventricle ependymoma and medulloblastoma based on enhanced MRI whole-tumor radiomics

LIAO Jian-yong¹, ZHANG Jie¹, GAO Pei-yi²

(1. Department of Radiology, Daxing Teaching Hospital of Capital Medical University, Beijing 102600, China;

2. Department of Radiology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100160, China)

Abstract: Objective: To investigate the application value of radiomics based on enhanced MRI in differentiating fourth ventricle ependymomas (EP) from medulloblastomas (MB), and to compare it with the manual film reading. **Methods:** A retrospective analysis was conducted on clinical and imaging data from surgically confirmed cases of EP and MB in the fourth ventricle, with 80 EP cases and 135 MB cases respectively. They were randomly divided into a training set (n=150) and a testing set (n=65) in a 7:3 ratio. Based on 18 radiomics features selected from T₁WI enhanced images and statistically significant clinical and imaging features, models were constructed using Logistic regression classifiers, including a radiomics model, a clinical imaging features model, and a combined model. The model performance was assessed by the area under the curve (AUC), and decision curve analysis. **Results:** The combined model exhibited the best diagnostic performance with an AUC of 0.981, and sensitivity, specificity, accuracy, and F1 score of 92.68%, 91.67%, 92.31%, and 0.938 respectively. The diagnostic performance of the combined model was superior to that of the clinical-imaging features model ($P<0.05$). The combined model also showed the highest net benefit. All three models demonstrated improvements in sensitivity, specificity, accuracy, and F1 score compared to manual film reading to varying degrees. **Conclusion:** Radiomics based on enhanced MRI is highly valuable for differentiating EP from MB, particularly the combined model, which can help to improve preoperative diagnostic accuracy.

Key words: Ependymoma; Medulloblastoma; Magnetic Resonance Imaging

髓母细胞瘤(Medulloblastoma, MB)和室管膜瘤(Ependymoma, EP)是儿童四脑室较常见的肿瘤类型。MB是恶性胚胎学肿瘤,具有侵袭性,而EP多局部缓慢生长,但易复发。由于两者生物学行为不同,手术方式、治疗方案以及预后均存在显著差异。因此术前精准诊断具有重要意义。常规MRI检查鉴别两者的准确率约为68%~86.05%^[1-2]。但EP常常发生间

变,而间变型EP和MB均可表现为DWI高信号及四脑室囊实性占位^[3]。此外,20%的MB无明显的弥散受限,不同分子类型的MB强化表现不一致,两者在发病年龄、临床表现也存在交叉,这些给术前精准诊断带来了不少的挑战^[3-4]。影像组学通过高通量提取肉眼无法观察获取的定量影像特征,可以应用于疾病的辅助诊断、疗效评估和预后预测^[5]。既往研

[收稿日期] 2024-04-01; **[修回日期]** 2024-05-20**[作者简介]** 廖建勇(1982-),男,北京人,副主任医师。E-mail: liaojianyong679@163.com**[通信作者]** 高培毅,首都医科大学附属北京天坛医院放射科,100160。E-mail: cjr.gaopeiyi@vip.163.com

究^[6-8]表明基于 T₁WI、T₂WI 或 ADC 影像组学鉴别 EP 和 MB 具有较好的效能。但研究样本量均较小,且未与人工阅片结果进行对比分析,存在一定局限性。基于此,本研究扩大了样本量,首次探讨基于增强 MRI 的影像组学方法鉴别两者的应用价值,并将其结果与人工阅片进行对比分析,为临床个性化诊治方案的制定提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析 2019 年 1 月—2021 年 12 月北京天坛医院经手术病理证实为四脑室 EP 和 MB 的患者 215 例,其中 EP 80 例,MB 135 例。收集并记录患者的性别、年龄、脑积水(双额角径与同一层面颅骨最大内径的比值,即 Evans 指数>0.33)、肿瘤轴位位置(肿瘤中心在水平轴上相对于中线的位置)、肿瘤垂直位置(肿瘤中心在垂直轴上相对于第四脑室中心的位置)、肿瘤大小(肿瘤在最长轴上的最大尺寸)、瘤周水肿(肿瘤边缘外的 T₂WI 高信号区域的最大线性长度)等相关数据。

纳入标准:①术前 2 周内行 MRI 检查;②患者行 MRI 检查前未经任何有创诊断和治疗。排除标准:①图像质量差,无法评价;②MRI 检查序列不完整;③四脑室未受累。

在缺乏临床资料和病理结果的情况下,两位拥有逾十年经验的神经影像医师独立审阅了影像资料,记录人工阅片结果。如结果不一致,则共同讨论决定。

1.2 研究方法

1.2.1 检查仪器及研究序列参数

采用 3.0T MRI 扫描仪(Siemens 或 GE)和 8 通道头线圈。Siemens 公司 MRI 扫描仪为 Trio Tim,扫描序列及参数:增强轴位 T₁WI(TR/TE 2 000/9.8 ms,矩阵 512×512,视野 22 cm×22 cm,层厚/层间距 5.0/1.5 mm);增强矢状位 T₁WI(TR/TE 1 760/11 ms,矩阵 512×512,视野 22 cm×22 cm,层厚/层间距 5.0/1.5 mm)。GE 公司 MRI 扫描仪为 Discovery MR750,扫描序列及参数:增强轴位 T₁WI(TR/TE 2 250/29 ms,矩阵 512×512,视野 24 cm×24 cm,层厚/层间距 5.0/1.5 mm);增强矢状位 T₁WI(TR/TE 1 760/25 ms,矩阵 512×512,视野 24 cm×24 cm,层厚/层间距 5.0/1.5 mm)。对比剂均为钆喷酸葡胺注射液,使用剂量为 0.2 mL/kg,经肘静脉快速注入后扫描。

1.2.2 感兴趣区勾画、特征提取与特征筛选

将 T₁WI 增强 MRI 图像以 DICOM 格式导入数坤智慧科研平台(Idea to Paper,Shukun Technology Co., Ltd.)后,一名 18 年工作经验的神经影像医师手动逐层勾画感兴趣区(图 1),从而获得病灶的感兴趣容积。为了评估评分员的内部重复性和评分员间一致性,由该名医师与另一名具有 15 年工作经验的副主任医师随机抽取 30 例病例逐层勾画感兴趣区。特征提取前对图像进行 N4ITK 算法校正偏置场、同性体素重采样、灰度归一化等预处理。提取的原始、小波变换(Wavelet)及高斯拉普滤波器(LoG)影像组学特征(2 个序列共 2 074 个)通过三轮筛选,分别是组内相关系数(阈值>0.85)评估特征的重复性和一致性,Pearson 相关系数(阈值<0.9)去冗余,最小绝对收缩与选择算子(LASSO)降维,筛选出重要特征。

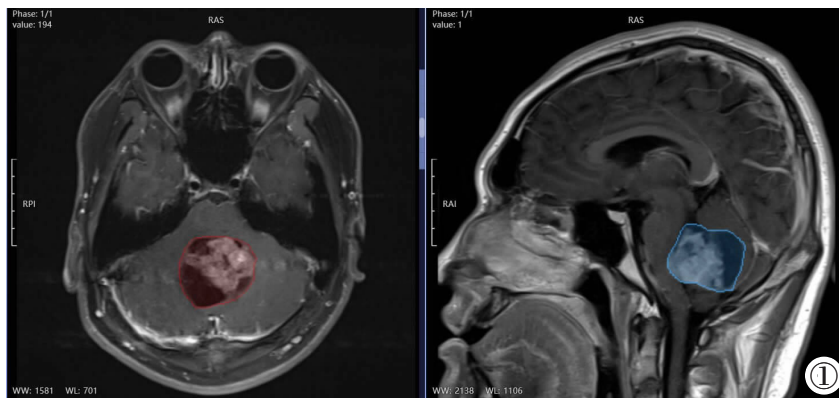


图 1 感兴趣区勾画示意图。

Figure 1. The diagram of the region of interest.

1.2.3 数据建模与评价

按照 7:3 随机划分为训练集(n=150)和测试集(n=65),通过特征筛选,建立逻辑回归分类器影像组学模型,并通过影像组学特征的系数公式得出影像组学评分(Radscore)。将临床及影像资料(年龄、性别、是否成年、肿瘤大小、肿瘤轴位位置、肿瘤垂直位置、脑积水、瘤周水肿)进行单因素分析,建立临床影像特征模型。将影像组学模型和临床影像特征模型进行整合,建立联合模型并绘制列线图。计算各模型的灵敏度、特异性、准确率、F1 分数等多种效能指标。绘制受试者工作特征(Receiver operating characteristic,ROC)曲线并计算曲线下面积(Area under the curve,AUC)评价模型效能。采用决策曲线分析评估模型的临床实用性。

1.3 统计学方法

采用 MedCalc v20.008 软件进行统计分析,计数资料以频数(占比)表示,行卡方检验。年龄不符合

正态分布,以中位数(四分位间距),行 Mann-Whitney U 检验。各模型的 AUC 值比较采用 Delong 检验。基于数坤智慧科研平台绘制 ROC 曲线及计算 AUC 值、准确率、敏感度、特异性、F1 分数等诊断效能指标。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床及影像资料结果

两组在年龄、是否成年、脑积水、肿瘤轴位位置、肿瘤垂直位置、瘤周水肿差异均有统计学差异($P<0.05$),而性别、肿瘤大小无统计学差异($P>0.05$),见表 1。

2.2 人工阅片结果

人工阅片在训练集的灵敏度、特异性、准确率、F1 分数分别是 73.33%、70%、72.09% 和 0.767,在测试集的灵敏度、特异性、准确率、F1 分数分别是

表 1 EP 与 MB 临床和影像资料的比较

	EP	MB	统计量	P
年龄	35(17,54)	7(6,12)	10.029	0.000 1
是否成年			87.486	0.000 1
≥18 岁	50(62.5%)	6(4.4%)		
<18 岁	30(37.5%)	129(95.6%)		
性别			0.760	0.059 3
女	32(40.0%)	46(34.1%)		
男	48(60.0%)	89(65.9%)		
脑积水			4.390	0.036 1
不存在	48(60.0%)	61(45.2%)		
存在	32(40.0%)	74(54.8%)		
肿瘤轴位位置			15.066	0.000 1
中线	64(80.0%)	130(96.3%)		
偏侧	16(20.0%)	5(3.7%)		
肿瘤垂直位置			73.506	0.000 1
上方	1(1.3%)	6(4.4%)		
中心	37(46.2%)	125(92.6%)		
下方	42(52.5%)	4(3.0%)		
肿瘤大小			0.369	0.831 5
≤2 cm	1(1.3%)	3(2.2%)		
>2~4 cm	17(21.2%)	31(23.0%)		
>4 cm	62(77.5%)	101(74.8%)		
瘤周水肿			19.276	0.000 1
无	66(82.5%)	72(53.3%)		
<1.5 cm	11(13.8%)	56(41.5%)		
≥1.5 cm	3(3.7%)	7(5.2%)		

73.17%、75%、73.85% 和 0.779。

2.3 特征筛选结果

按照 7:3 随机划分训练集 (56 例 EP 和 94 例 MB) 和测试集 (24 例 EP 和 41 例 MB), 共筛选出 12 个重要影像组学特征(图 2), 并计算 Radscore(图 3)。

2.4 机器学习模型的建立及效能评价

3 种模型灵敏度、特异性、准确率、F1 分数较人工阅片均有不同程度的提高(表 2)。联合模型的诊断效能最高(图 4), 且优于临床影像特征模型($P<0.05$)(表 3)。决策曲线分析显示联合模型的净收益高于临床影像特征模型和影像组学模型(图 5)。典型病例见图 6。联合模型的列线图见图 7。

3 讨论

MB、EP 和毛细胞星形细胞瘤是儿童后颅窝最常见的三种类型肿瘤^[9]。后颅窝 EP 好发于四脑室,

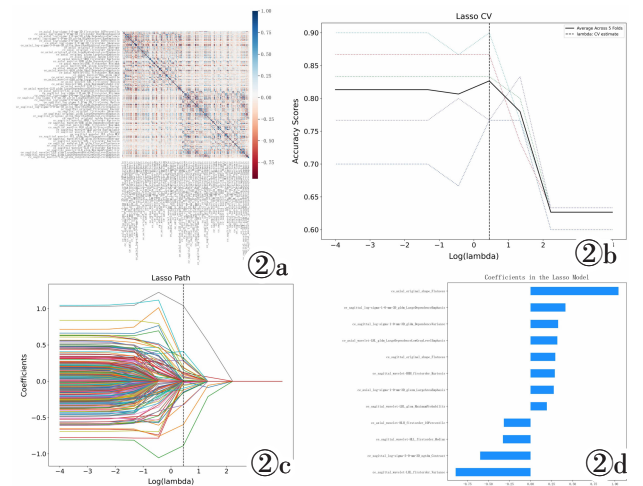


图 2 筛选影像组学特征。图 2a: Pearson 相关去冗余。图 2b: 在 LASSO 方法中采用 5 折交叉检验寻找最佳参数(λ)。图 2c: 所选特征的 LASSO 剖面图。图 2d: 所选特征的权重图。

Figure 2. Screening of radiomic features. Figure 2a: Pearson correlation for redundancy removal. Figure 2b: Employing 5-fold cross-validation in the LASSO method to find the optimal parameter (λ). Figure 2c: LASSO profile of selected features. Figure 2d: Weight map of selected features.

表 2 人工阅片与机器学习各模型在测试集的诊断性能比较

	灵敏度	特异性	准确率	F1 分数
影像组学模型	75.61%	95.83%	83.08%	0.849
临床影像特征模型	90.24%	87.50%	89.23%	0.914
联合模型	92.68%	91.67%	92.31%	0.938
人工阅片	73.17%	75.00%	73.85%	0.779

$$\begin{aligned} \text{Radscore} = & 0.2750 \times \text{ce_axial_log-sigma-1-0-mm-3D_glszm_LargeAreaEmphasis} + 1.0429 \times \text{ce_axial_original_shape_Flatness} - 0.3166 \times \text{ce_axial_wavelet-HLH_firstorder_10Percentile} + \\ & 0.3181 \times \text{ce_axial_wavelet-LHL_gldm_LargeDependenceLowGrayLevelEmphasis} + 0.3269 \times \text{ce_sagittal_log-sigma-1-0-mm-3D_gldm_DependenceVariance} + \\ & 0.4133 \times \text{ce_sagittal_log-sigma-1-0-mm-3D_gldm_LargeDependenceEmphasis} - 0.5977 \times \text{ce_sagittal_log-sigma-3-0-mm-3D_ngtdm_Contrast} + \\ & 0.2929 \times \text{ce_sagittal_original_shape_Flatness} + 0.2875 \times \text{ce_sagittal_wavelet-HHH_firstorder_Kurtosis} - 0.3275 \times \text{ce_sagittal_wavelet-HLL_firstorder_Median} - \\ & 0.8882 \times \text{ce_sagittal_wavelet-LHL_firstorder_Variance} + 0.1930 \times \text{ce_sagittal_wavelet-LHL_gldm_MaximumProbability} \end{aligned}$$

图 3 Radscore 公式。

Figure 3. Radscore equation.

表 3 3 个模型在训练集和测试集的 AUC 值比较

	训练集		测试集	
	AUC(95%CI)	P	AUC(95%CI)	P
临床影像特征模型	0.904(0.845~0.962)	—	0.916(0.824~1.000)	—
影像组学模型	0.970(0.946~0.994)	0.015	0.950(0.904~0.996)	0.474
联合模型	0.976(0.954~0.999)	0.003	0.981(0.954~1.000)	0.036

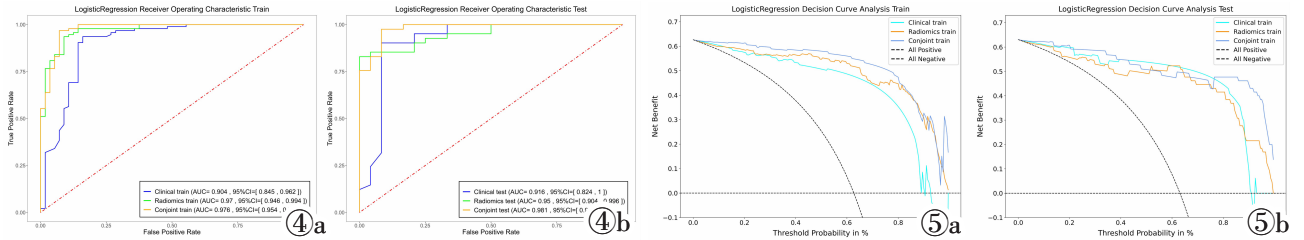


图 4 3 种模型在训练集(图 4a)和测试集(图 4b)中的 ROC 曲线分析结果。图 5 3 种模型在训练集(图 5a)和测试集(图 5b)中的决策曲线分析结果。

Figure 4. ROC curve analysis results of the three models in the training set (Figure 4a) and test set (Figure 4b). Figure 5. Decision curve analysis results of the three models in the training set(Figure 5a) and test set(Figure 5b).

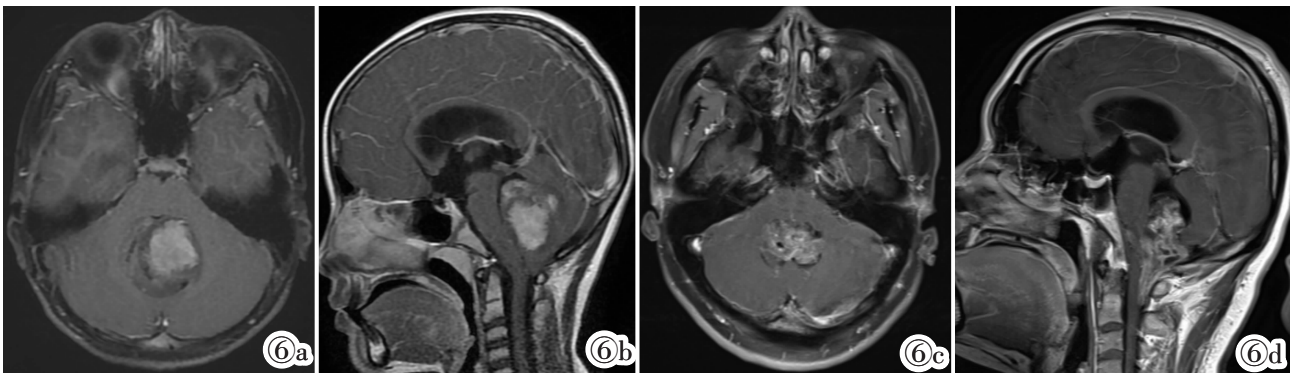


图 6 典型病例。图 6a,6b:女,8 岁,MB,Radscore 为 0.931,联合模型预测概率为 96.09%。图 6c,6d:男,28 岁,EP,Radscore 为-5.156,联合模型预测概率为 99.99%。

Figure 6. Typical cases. Figure 6a, 6b: Female, 8 years old, MB, Radscore of 0.931, combined model prediction probability of 96.09%. Figure 6c, 6d: Male, 28 years old, EP, Radscore of -5.156, combined model prediction probability of 99.99%.

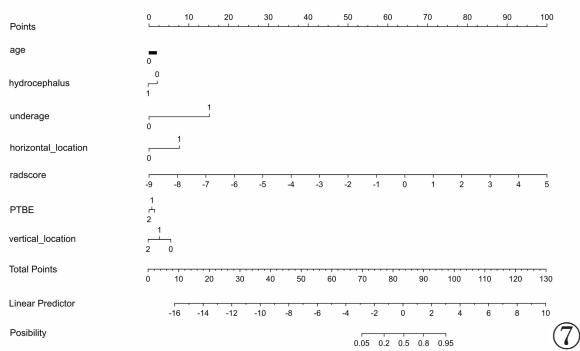


图 7 联合模型列线图。

Figure 7. Nomogram of the combined model.

多见于儿童和青少年,也可见于成年人,发病年龄范围较宽,而 MB 好发于小脑蚓部,常常侵入四脑室内,多见于儿童^[10]。常规 MRI 检查鉴别两者的准确率介于 68%和 86.05%之间,与本研究人工阅片的准确率(73.85%)相仿。但 EP 发生间变时,可与 MB 表现类似,鉴别存在困难^[11]。此外,成人 MB 的 MRI 表

现为“同病异影”,极易引起误诊^[12]。

本研究筛选的 12 个特征中,权重最大的前 3 个特征分别是轴位图像的形状特征扁平度(系数=1.0429)、矢状位图像的一阶特征方差(系数=-0.8882)和纹理特征对比度(系数=-0.5977)。EP 更易出现“浇注”征象,在轴位图像上表现为向四脑室 Magendie 孔及双侧 luschka 可塑性生长,甚至可达桥小脑角区及小脑延髓池、颈髓后方,形状更具扁平性,而 MB 更常见于各方向同速生长,表现为球形或类球形。方差反映图像像素强度的多样性,纹理对比度则反映局部灰度的变换。EP 内部更易出现囊变、坏死、钙化、出血,像素强度差异更大,局部灰度变化更强,而 MB 内部则为紧密的细胞呈菊团状排列,内部信号相对更均匀^[13]。

本研究基于增强 T₁WI 影像组学特征,结合临床及影像资料,采用逻辑回归分类器建立联合模型,鉴别 EP 和 MB 的准确率、敏感度和 AUC 值分别高达

92.31%、92.68%及 0.981。结果明显优于传统的人工阅片方法。此外,决策曲线分析显示了本研究的临床实用性。

近年来,已有许多研究探讨功能成像、直方图、纹理等方法对鉴别 EP 和 MB 的应用价值^[4,14-16]。石锦等^[14]研究发现平均 ADC 值、最小 ADC 值鉴别 EP 和 MB 的 AUC 分别为 0.841、0.898。Duc^[4]回顾 40 例 MB 和 9 例 EP 的 MRS 检查发现胆碱/N-乙酰天冬氨酸鉴别两者的 AUC 值最佳,为 0.803。冯奇星等^[15-16]基于 14 例儿童后颅窝 EP 和 22 例 MB 的 T₂-FLAIR 图像,在灰度直方图研究中发现第 90 百分位数鉴别 EP 和 MB 的 AUC 值和敏感度分别为 0.802 及 86.36%,在纹理研究中发现灰度游程矩阵的长游程优势鉴别两者的 AUC 值及敏感度分别为 0.818 及 77.27%。与以上四项研究相关,本研究的 AUC 值及敏感度均显著提高,究其原因可能为:其一,本研究样本量相对较大,具有更丰富的数据特征和更强的泛化能力;其二,本研究融合了更广泛的特征,包括直方图特征、形状特征、纹理特征和高阶特征等,可以更全面挖掘肿瘤内部的相关信息。事实上,本研究筛选的 12 个特征中有 10 个来自于高阶特征(小波变换、高斯拉普滤波器)。

在影像组学研究方面。庄义江等^[9]基于 ADC 图建立的联合影像组学模型,采用留一法验证,鉴别 EP 和 MB 的效能高达 0.979。但该研究的样本量较小,研究结果的可重复性和泛化性需要进一步进行外部验证。张科珍等^[7]基于 T₁WI 和 T₂WI 图像筛选的 24 个特征,建立支持向量机模型,鉴别 EP 和 MB 的 AUC 值和准确率分别高达 0.963 7 及 88.89%。本研究联合模型的 AUC 值和准确率均略高于此研究,可能是因为本研究联合模型额外纳入了临床及影像资料,丰富了患者特征数据,提高了模型的预测性能。Dong 等^[17]对 51 例后颅窝肿瘤(24 例 EP 和 27 例 MB)患者研究发现,基于增强 T₁WI 和 ADC 图像 5 个特征的随机森林模型鉴别效能最好,AUC 值为 0.91。本研究结果优于该研究,主要是因为本研究的样本量较大,避免了过拟合的风险。此外,本研究提取的特征较多,每个病例提取 2 074 个特征,而该研究只提取 188 个特征。

本研究的局限性:其一,本研究为单中心研究,且未设置外部验证集,这可能限制了样本的多样性和代表性,结果可能存在偏倚;其二,本研究感性兴趣均为手工逐层勾画,虽然采用 ICC 规避差异,但不可避免人主观因素的影响。今后有待和其他机构合作,扩大样本量,设置验证集,使用自动分割方法

进一步研究。

综上所述,纳入临床、影像资料有助于提高模型的诊断性能;基于增强 MRI 影像组学对鉴别 EP 和 MB 具有较高的临床应用价值,特别是联合模型,有助于提高术前诊断准确率。

[参考文献]

- [1]张延辉,赵阳,雷静. 核磁共振成像诊断儿童髓母细胞瘤的准确性及影像学特征分析[J]. 中国妇幼保健,2022,37(4):755-758.
- [2]顾卫彬,侯欣怡,马丁,等. 磁共振扩散加权成像在儿童髓母细胞瘤诊断中的价值[J]. 放射学实践,2018,33(9):956-960.
- [3]赵丽,李金凝,毛海佳,等. 儿童幕下间变室管膜瘤与髓母细胞瘤 CT 及 MRI 表现的对比研究 [J]. 浙江医学,2019,41 (17):1886-1888.
- [4]Duc NM. The impact of magnetic resonance imaging spectroscopy parameters on differentiating between paediatric medulloblastoma and ependymoma[J]. Contemp Oncol(Pozn), 2021, 25(2): 95-99.
- [5]Lambin P, Rios-Velazquez E, Leijenaar R, et al. Radiomics: extracting more information from medical images using advanced feature analysis[J]. Eur J Cancer, 2012, 48(4): 441-446.
- [6]庄义江,黄钰纯,唐雨曼,等. 基于 ADC 影像组学鉴别诊断儿童髓母细胞瘤与间变型室管膜瘤[J]. 放射学实践,2021,36(10):1265-1270.
- [7]张科珍,王刚,段静静,等. 影像组学对髓母细胞瘤及室管膜瘤诊断价值的研究[J]. 临床放射学杂志,2023,42(9):1399-1402.
- [8]彭雪华,邵剑波,郭豫,等. 基于 MRI 的影像组学分析在鉴别儿童髓母细胞瘤与室管膜瘤中的应用 [J]. 临床放射学杂志,2021,40(4):779-782.
- [9]Albalkhi I, Bhatia A, Losch N, et al. Current state of radiomics in pediatric neuro-oncology practice: a systematic review [J]. Pediatr Radiol, 2023, 53(10): 2079-2091.
- [10]Dong J, Li L, Liang S, et al. Differentiation Between Ependymoma and Medulloblastoma in Children with Radiomics Approach[J]. Acad Radiol, 2021, 28(3): 318-327.
- [11]薛彩强,李昇霖,刘显旺,等. MRI 征象及 ADC 值鉴别成人颅内髓母细胞瘤与室管膜瘤的价值 [J]. 中国医学物理学杂志, 2022,39(10):1244-1249.
- [12]卿时军,江登科,靳瑞娟. 成人髓母细胞瘤 MRI 表现及误诊分析 [J]. 影像诊断与介入放射学,2022,31(5):340-345.
- [13]薛晶,杜娟,苏丽萍,等. 后颅窝室管膜瘤临床病理分析[J]. 新疆医学,2024,54(3):251-254.
- [14]石锦,张建军,张睿. MRI-DWI 诊断儿童后颅窝肿瘤的临床价值 [J]. 中国 CT 和 MRI 杂志,2023,21(7):22-23.
- [15]冯奇星,边雪玲,穆新暖,等. MRI 灰度游程矩阵对儿童幕下髓母细胞瘤与室管膜瘤的鉴别诊断价值 [J]. 中国中西医结合影像学杂志,2022,20(4):315-318.
- [16]冯奇星,边雪玲,穆新暖,等. 基于 T₂-FLAIR 灰度直方图鉴别儿童幕下髓母细胞瘤与室管膜瘤 [J]. 医学影像学杂志,2023,33(1):1-5.
- [17]Dong J, Li L, Liang S, et al. Differentiation Between Ependymoma and Medulloblastoma in Children with Radiomics Approach[J]. Acad Radiol, 2021, 28(3): 318-327.