

• 临床研究 •

原发性肝细胞癌患者术前 NLR、PLR 与术后微血管浸润的关系*

廖芮, 陈凯, 李有赞, 唐几超, 张娜, 杨洪吉[△]

646000 四川 泸州, 西南医科大学 临床医学院(廖芮、李有赞、唐几超、杨洪吉); 610072 成都, 四川省医学科学院/四川省人民医院 器官移植中心(陈凯、杨洪吉); 610083 成都, 中国人民解放军西部战区总医院 肝胆外科(张娜)

[摘要] 目的: 探讨原发性肝细胞癌患者(hepatocellular carcinoma, HCC)术前评估外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值(neutrophil to lymphocyte ratio, NLR)、血小板与淋巴细胞比值(platelet to lymphocyte ratio, PLR)与患者术后微血管浸润(microvascular infiltration, MVI)的关系。方法: 回顾性分析本院 2016 年 1 月至 2019 年 12 月期间行根治性手术切除且经术后病理确诊的 224 例 HCC 患者的临床资料, 并按照术后病理诊断分为 MVI 阴性组和 MVI 阳性组, 比较两组患者 NLR、PLR 值之间的差异, 并利用多因素 Logistic 回归模型分析 NLR、PLR 值与 MVI 之间的关系。结果: 单因素分析显示, MVI 阳性与 MVI 阴性两组 HCC 患者在 NLR、PLR、术前甲胎蛋白水平(alpha-fetoprotein, AFP)、术前谷丙转氨酶、肿瘤大小、肿瘤分化程度之间的差异有统计学意义(均 $P < 0.05$); 而谷丙转氨酶、TNM 临床分期在两组 HCC 患者间差异无统计意义(均 $P > 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析结果显示: NLR (≥ 1.95 / < 1.95)、术前 AFP ($> 400 \mu\text{g/L}$ / $\leq 400 \mu\text{g/L}$) 和低分化是 HCC 患者 MVI 的独立危险因素, OR 值分别为 2.289、3.111 和 1.363。结论: 术前 NLR 和 AFP 水平可以用于预测 HCC 患者 MVI, 可以为 HCC 的临床诊疗工作中治疗方案的选择提供参考。

[关键词] 肝细胞癌; 根治性切除术; 中性粒细胞与淋巴细胞比值; 血小板与淋巴细胞比值; 微血管浸润

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2021.02.004

引文格式: Liao R, Chen K, Li Y, et al. Relations of preoperative NLR and PLR to microvascular infiltration in patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Control Treat, 2021, 34(2): 117-121. [廖芮, 陈凯, 李有赞, 等. 原发性肝细胞癌患者术前 NLR、PLR 与术后微血管浸润的关系[J]. 肿瘤预防与治疗, 2021, 34(2): 117-121.]

Relations of Preoperative NLR and PLR to Microvascular Infiltration in Patients with Hepatocellular Carcinoma

Liao Rui, Chen Kai, Li Youzan, Tang Jichao, Zhang Na, Yang Hongji

School of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China (Liao Rui, Li youzan, Tang Jichao, Yang Hongji); Multi-Organ Transplant Center, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan, China (Chen Kai, Yang Hongji); Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083, Sichuan, China (Zhang Na)

Corresponding author: Yang Hongji, E-mail: hongji-yang65@126.com

This study was supported by grants from Health and Family Planning Commission of Sichuan Province (No. 150192).

[Abstract] **Objective:** To explore the relations of preoperative neutrophil lymphocyte ratio (NLR) and platelet lymphocyte ratio (PLR) to postoperative MVI in patients with primary hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** The clinical

data of 224 HCC patients who underwent radical resection and were confirmed by postoperative pathology in our hospital from January 2016 to December 2019 were retrospectively analyzed. The patients were assigned to the MVI - group and the MVI + group according to the postoperative pathological diagnosis.

[收稿日期] 2020-08-09 **[修回日期]** 2020-12-30

[基金项目] * 四川省卫生与计划生育委员会科研课题(编号:150192)

[通讯作者] [△] 杨洪吉, E-mail: hongji-yang65@126.com

The differences in NLR and PLR between the two groups were compared. The relations of NLR and PLR to MVI was analyzed by multivariate logistic regression model. **Results:** Univariate analysis showed that there were significant differences in NLR, PLR, preoperative AFP, preoperative alanine aminotransferase, tumor size and tumor differentiation between two groups (all $P < 0.05$), while there were no significant differences in aspartate aminotransferase and TNM stage between the two groups (all $P > 0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that NLR ($\geq 1.95 / < 1.95$, $OR = 2.289$), preoperative alpha fetoprotein ($> 400 \mu\text{g/L} / \leq 400 \mu\text{g/L}$, $OR = 3.111$) and low differentiation ($OR = 1.363$) were independent risk factors for MVI in HCC patients. **Conclusion:** Preoperative NLR and AFP levels can be used to predict MVI in HCC patients, which can provide experience for the selection of options in clinical diagnosis and treatment of HCC.

[**Key words**] Hepatocellular carcinoma; Radical resection; Neutrophil to lymphocyte ratio; Platelet to lymphocyte ratio; Microvascular infiltration

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国最为常见的消化道恶性肿瘤之一^[1-2], 同时, 我国也是全球 HCC 疾病负担最重的国家, 约有超过一半的 HCC 患者发生在中国^[3-4]。据 2015 年中国肿瘤登记数据显示, 我国 HCC 的发病率和死亡率分别为 26.92/10 万和 23.72/10 万, 分别位居我国全部恶性肿瘤发病和死亡的第 4 位和第 2 位^[5]。HCC 的检测与诊断有助于识别高危人群, 并对疾病严重程度的判断及临床预后的预测有重要意义^[6]。近年来, 关于外周血中性粒细胞与淋巴细胞比值 (neutrophil to lymphocyte ratio, NLR)、血小板与淋巴细胞比值 (platelet to lymphocyte ratio, PLR) 作为 HCC 等多种实体肿瘤病情及预后评价的预测指标的相关研究受到了广泛关注^[7-8]。已有研究证实, 微血管浸润 (microvascular infiltration, MVI) 是 HCC 患者术后复发及预后生存的独立危险因素, 其主要机制与癌细胞早期通过血管传播有关^[9-10]。然而关于 NLR、PLR 与患者术后 MVI 的相关性研究却鲜有报道。因此, 本研究拟探讨 NLR、PLR 与 HCC 患者术后 MVI 情况并进行对比分析, 旨在阐明 NLR、PLR 指标预测 MVI 风险的潜在价值。

1 对象与方法

1.1 研究对象

回顾性收集四川省人民医院 2016 年 1 月至 2019 年 12 月期间行根治性手术切除且经术后病理确诊的 224 例 HCC 患者作为研究对象。纳入标准: 1) 年龄 18 ~ 80 岁, 性别不限; 2) 行根治性切除手术, 手术符合 R0 标准^[11]; 3) 术前肝功能 Child Pugh 评级为 A-B 级, 术后经病理确诊为 HCC, 且符合原发性肝癌规范化病理诊断指南的标准^[12]。排除标准: 1) 合并有血液系统疾病、感染性疾病、肾脏疾病等影响血液指标的疾

病; 2) 合并其他部位实体恶性肿瘤; 3) 术前行抗凝治疗、输血治疗等影响血液指

1.2 研究方法

1.2.1 资料收集 通过医院电子病案系统收集患者相关电子病历、复核存档的纸质病历及病理结果报告, 由研究者本人负责收集、汇总。主要包括: 1) 一般资料包括性别、年龄、身高、体质量、BMI、肝功能 Child Pugh 分级、巴塞罗那 (Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC) 临床分期、基础疾病 (糖尿病、高血压等)、基础肝病 (乙肝、丙肝、肝硬化、肝腹水等)、吸烟、饮酒等; 2) 临床病理资料包括肿瘤大小、肿瘤部位、术后病理类型、术前甲胎蛋白水平 (alpha-fetoprotein, AFP)、谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)、CA19-9、MVI、TNM 分期 (参照 AJCC 2010 年第 7 版)、肿瘤分化程度等; 3) 术前最近一次血常规资料主要包括中性粒细胞计数 (NEU)、淋巴细胞计数 (LYM)、血小板计数 (PLT) 等, 并计算 NLR (NEU/LYM)、PLR (PLT/LYM)。

1.2.2 术后随访 所有患者手术出院后均采用门诊随访方式进行随访, 随访截止日期为 2020 年 6 月 30 日。术后 6 个月内, 所有患者每月复查血清 AFP、肝功能, 肿瘤标志物 CEA、CA19-9, 肝脏超声和 (或) 腹部 CT 或 MRI、胸部 X 线等; 术后 6 ~ 24 个月, 每 3 个月复查一次, 术后 2 年以后, 每半年复查一次, 复查内容同上。术后复发以临床及影像学检查确定, 参照《原发性肝癌诊疗规范 (2011 年版)》^[13] 进行诊断。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行统计学分析, 对服从正态分布或近似服从正态分布的计量资料采用均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用两独立样本的 t 检验; 非正态分布的计量资料采用中位数四分位间距表示, 组

间比较采用 Wilcoxon 非参数秩和检验;计数资料采用率/百分比/构成比(%)表示,组间比较采用卡方检验;利用多因素 Logistic 回归模型分析 NLR、PLR 值与 MVI 之间的关系。以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般及临床资料

本研究共纳入符合条件的 HCC 患者 224 例,其中男性 175 例(78.13%),女性 49 例(21.87%),男女性别比为 3.58:1;患者年龄 32~78 岁,平均年龄(52.41±8.73)岁;平均 BMI(21.90±2.12)kg/m²;合并乙型肝炎患者 120 例(53.57%)、丙型肝炎 23 例(10.27%)、肝硬化 51 例(22.77%)、其他肝脏疾病 30 例(13.39%);肝功能 Child Pugh 分级为 A 级 205 例(91.52%)、B 级 19 例(8.48%);巴塞罗那(BCLC)临床分期为 0 期 14 例(6.25%)、A 期 149 例(66.52%)、B 期 61 例(27.23%);肿瘤最大直径

(5.80±2.37)cm,其中 <5cm 有 90 例(40.18%)、≥5cm 有 134 例(59.82%);术前 AFP 169(4~106 689)μg/L;术前 AST 37(14~254)U/L;术前 ALT 31(7~206)U/L;肿瘤分化程度:高分化 53 例(23.66%)、中分化 136 例(60.71%)、低分化 35 例(15.63%);TNM 分期:I 期 78 例(34.82%)、II 期 68 例(30.36%)、III 期 78 例(34.82%);术前 NLR 1.95(1.35~3.71);术前 PLR(130.00±68.71);术后病理诊断发现存在 MVI 59 例(26.34%)、无 MVI 165 例(73.66%)。

2.2 两组 HCC 患者术前 NLR、PLR 及主要临床病理参数的单因素分析

单因素分析显示,MVI 阳性与 MVI 阴性两组 HCC 患者在 NLR、PLR、术前 AFP、术前 ALT、肿瘤大小、肿瘤分化程度之间存在统计学差异(均 $P < 0.05$);而 AST、TNM 临床分期在两组 HCC 患者间差异无统计意义(均 $P > 0.05$)(表 1)。

表 1 HCC 患者术前 NLR、PLR 及主要临床病理参数与术后 MVI 关系的单因素分析

Table 1. Univariate Analysis of the Relation of Postoperative MVI to Preoperative NLR, PLR and Main Clinicopathological Parameters for Two Groups of HCC Patients

Variable	MVI+ (n=59)		MVI- (n=165)		χ^2	P
	N	Ratio (%)	N	Ratio (%)		
NLR					15.349	<0.001
<1.95	13	22.03	85	51.52		
≥1.95	46	77.97	80	48.48		
PLR					4.978	0.026
<130.0	18	30.51	78	47.27		
≥130.0	41	69.49	87	52.73		
Preoperative AFP (μg/L)					28.187	<0.001
≤400	12	20.34	100	60.61		
>400	47	79.66	65	39.39		
Preoperative ALT (U/L)					5.470	0.019
≤60	34	57.63	122	73.94		
>60	25	42.37	43	26.06		
Preoperative AST (U/L)					2.717	0.099
≤60	33	55.93	112	67.88		
>60	26	44.07	53	32.12		
Tumor size (cm)					4.304	0.038
<5 cm	17	28.81	73	44.24		
≥5 cm	42	71.19	92	55.76		
Degree of tumor differentiation					25.050	<0.001
Well differentiated	5	8.47	48	29.09		
Moderately differentiated	34	57.63	102	61.82		
Poorly differentiated	20	33.90	15	9.09		
TNM stage					4.848	0.089
I	15	25.42	63	38.18		
II	17	28.81	51	30.91		
III	27	45.76	51	30.91		

NLR and PLR were classified by median or average levels.

NLR: Neutrophil to lymphocyte ratio; PLR: Platelet to lymphocyte ratio; HCC: hepatocellular carcinoma; MVI: Microvascular infiltration; AFP: Alpha fetoprotein; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase.

2.3 HCC 患者术前 NLR、PLR 及临床病理参数与术后 MVI 的 Logistic 回归分析

以术后病理诊断 MVI 作为因变量 (MVI + : $Y = 1$, MVI - : $Y = 0$), 将单因素分析有统计学意义的 NLR、PLR 变量引入模型作为自变量, 同时纳入单因素分析有统计学意义的临床病理参数 (术前 AFP、术前 ALT、肿瘤大小、肿瘤分化程度) 作为协变量,

进行多因素 Logistic 回归分析 (变量筛选方法: Forward: LR, 变量入选标准 $\alpha = 0.05$, 排除标准为 0.1)。结果显示: NLR ($\geq 1.95 / < 1.95$)、术前 AFP ($> 400 \mu\text{g/L} / \leq 400 \mu\text{g/L}$) 和肿瘤分化程度 (低分化) 是 HCC 患者 MVI 的独立危险因素, OR 值分别为 2.289、3.111 和 1.363 (表 2)。

表 2 HCC 患者术前 NLR、PLR 及临床病理参数与术后关系 MVI 的 Logistic 回归分析

Table 2. Logistic Regression Analysis of the Relation of Postoperative MVI to Preoperative NLR, PLR and Clinicopathological Parameters for HCC Patients

Variable	β	OR (95% CI)	χ^2	P
NLR				
<1.95		1		
≥ 1.95	0.813	2.289 (1.270 ~ 4.017)	10.251	0.001
Preoperative AFP				
$\leq 400 \mu\text{g/L}$		1		
$> 400 \mu\text{g/L}$	1.135	3.111 (1.112 ~ 6.127)	15.461	<0.001
Degree of tumor differentiation				
Well differentiated		1		
Moderately differentiated	-0.197	0.821 (0.201 ~ 3.357)	1.911	0.165
Poorly differentiated	0.310	1.363 (1.109 ~ 1.712)	8.157	0.003

Abbreviations as indicated in Table 1.

3 讨论

肝癌根治性切除手术目前仍是治疗 HCC 的首选方式^[14]。随着外科技术的不断进步以及对 HCC 研究的不断深入, HCC 的诊治水平也在不断提高, 但是仍然有超过 80% 的 HCC 患者在确诊时已进展为中晚期, 因此 HCC 诊治的关键在于早期诊断^[15]。已有研究证实^[16], HCC 的发生、发展及侵袭、转移过程与机体的炎症反应有着密切关系。中性粒细胞的增多、淋巴细胞的减少是肿瘤患者炎症反应的非特异性表现之一, 并且与包括 HCC 在内的多种恶性肿瘤的不良预后有关^[17]。而外周血 NLR、PLR 是机体炎症反应与免疫状态的组合指标, NLR、PLR 水平的升高提示机体炎症状态的持续和免疫水平的下降^[18]。

MVI 是指肝血管内存在微转移性肝癌栓子, 越来越多的研究显示^[19-20], MVI 是 HCC 患者术后早期复发及预后死亡的独立危险因素, 同时还发现行根治性切术后 MVI 阳性的 HCC 患者的无进展生存期明显低于 MVI 阴性患者。本研究中有 26.3% (59/224) 的 HCC 患者术后病理证实存在 MVI。这与文献报道的比例较为接近^[21-22]。目前 MVI 只能通过手术标本的组织病理学诊断来确定, 因此, 通过

术前评估检查来预测 HCC 患者是否存在 MVI 对于 HCC 的早期准确诊断显得尤为重要, 如可以根据 MVI 的预测结果可以选择性行解剖性、非解剖性肝切除术, 或肝切除术中联合其他治疗, 以及术中是否采用肿瘤扩大切缘等。

机体的炎症反应与 HCC 的发生、发展有着密切联系。本研究结果显示, 术后病理 MVI 阳性 HCC 患者的 NLR、PLR 水平高于 MVI 阴性组。进一步将 NLR、PLR 按照中位水平分组分析发现, 术前 NLR、PLR 高水平与患者 MVI 阳性存在相关性。研究结果表明^[23], 在非可控性的细胞恶性转化过程, 炎性细胞扮演了重要的角色, 即 HCC 患者体内出现了高中性粒细胞、低淋巴细胞免疫应答为主的免疫效应, 以及以血小板为介导的促肿瘤生长、低淋巴细胞表达的炎症反应现象。还有研究认为^[24], 中性粒细胞参与激发了可以启动及促进恶性肿瘤细胞发展的突变环境, 并进一步认为中性粒细胞可能是 HCC 患者发生微血管侵犯的媒介。本组资料进一步的多因素 Logistic 回归分析发现, 术前 NLR ($\geq 1.95 / < 1.95$)、术前 AFP ($> 400 \mu\text{g/L} / \leq 400 \mu\text{g/L}$) 和肿瘤分化程度 (低分化) 是 HCC 患者 MVI 的独立危险因素, OR 值分别为 2.289、3.111 和 1.363。因此, NLR 和 AFP 有望成为一种简单、经济、便捷的预测指标, 用

于 HCC 患者术前为血管侵犯的预测,并辅助指导临床循证的选择最佳的治疗方式。

综上所述,术前 NLR 和 AFP 水平可以用于预测 HCC 患者 MVI,可以为 HCC 的临床诊疗工作中治疗方案的选择提供参考。但由于本研究为较小样本量的回顾性、单中心研究,故研究结论还需进一步证实。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(2):477-491.
- [2] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10127):1301-1314.
- [3] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8):1941-1953.
- [4] Yang JD, Hainaut P, Gores GJ, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: Trends, risk, prevention and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(10):589-604.
- [5] 查震球,戴丹,贺琴,等. 安徽省肿瘤登记地区 2014 年肝癌流行特征分析[J]. *肿瘤预防与治疗*,2019,32(11):984-987.
- [6] Cai J, Wang K, Han T, et al. Evaluation of prognostic values of inflammation-based makers in patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure[J]. *Medicine(Baltimore)*, 2018, 97(46):e13324.
- [7] Uchinaka EI, Amisaki M, Yagyu T, et al. Prognostic significance of pre-surgical combined platelet count and neutrophil-lymphocyte ratio for patients with hepatocellular carcinoma [J]. *In Vivo*, 2019, 33(6):2241-2248.
- [8] Chen K, Zhan MX, Hu BS, et al. Combination of the neutrophil to lymphocyte ratio and the platelet to lymphocyte ratio as a useful predictor for recurrence following radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1):315-323.
- [9] Rungsakulkij N, Mingphruedhi S, Suragul W, et al. Platelet-to-lymphocyte ratio and large tumor size predict microvascular invasion after resection for hepatocellular carcinoma [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(12):3435-3441.
- [10] 李豪,陈国勇,魏思东,等. 原发性肝癌患者肝切除术后复发影响因素分析[J]. *中国肝脏病杂志(电子版)*,2019,11(3):69-74.
- [11] 中华医学会外科学分会肝脏外科学组. 肝细胞癌外科治疗方法的选择专家共识(2016 年第三次修订) [J]. *中华消化外科杂志*,2017,16(2):113-115.
- [12] 全国肝胆肿瘤及移植病理协作组. 原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015 年版) [J]. *中华肝胆外科杂志*,2015,21(3):145-151.
- [13] 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范(2011 年版)摘要[J]. *中华肝脏病杂志*,2012,20(6):419-426.
- [14] 李民,熊俊. 《原发性肝癌诊疗规范(2017 年版)》解读[J]. *中国普通外科杂志*,2019,28(7):785-789.
- [15] 刘毓键,马明洋. 血清标志物在肝细胞肝癌早期诊断中的研究进展及应用前景[J]. *医学综述*,2020,26(7):1325-1330,1336.
- [16] Zhang Q, He Y, Luo N, et al. Landscape and dynamics of single immune cells in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell*, 2019, 179(4):829-845.
- [17] Lu C, Rong D, Zhang B, et al. Current perspectives on the immunosuppressive tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: Challenges and opportunities [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):130.
- [18] Itoh S, Yugawa K, Shimokawa M, et al. Prognostic significance of inflammatory biomarkers in hepatocellular carcinoma following hepatic resection [J]. *BJS Open*, 2019, 3(4):500-508.
- [19] Kim JG, Jang KM, Min GS, et al. Questionable correlation of the apparent diffusion coefficient with the histological grade and microvascular invasion in small hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Radiol*, 2019, 74(5):406.
- [20] Imura S, Teraoku H, Yoshikawa M, et al. Potential predictive factors for microvascular invasion in hepatocellular carcinoma classified within the Milan criteria [J]. *Int J Clin Oncol*, 2018, 23(1):98-103.
- [21] Erstad DJ, Tanabe KK. Prognostic and therapeutic implications of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2019, 26(5):1474-1493.
- [22] Zhao H, Chen C, Fu X, et al. Prognostic value of a novel risk classification of microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma after resection [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(3):5474-5486.
- [23] Tan W, Sun W, Li X, et al. Preablation neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent prognostic factor in locally advanced hepatocellular carcinoma patients following radiofrequency ablation [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(1):84-89.
- [24] Zhang X, Li J, Shen F, et al. Significance of presence of microvascular invasion in specimens obtained after surgical treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 33(2):347-354.