

# Khảo sát nồng độ haptoglobin huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

## Survey on plasma haptoglobin concentrations in patients with end stage renal diseases at 108 Military Central Hospital

Đinh Thị Thảo, Nguyễn Cẩm Thạch

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

### Tóm tắt

*Mục tiêu:* Khảo sát nồng độ haptoglobin ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối. Bước đầu tìm hiểu mối tương quan giữa nồng độ haptoglobin và sắt huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối. *Đối tượng và phương pháp:* Nghiên cứu tiến cứu mô tả cắt ngang nồng độ haptoglobin trên 77 bệnh nhân bị bệnh thận mạn giai đoạn cuối, so sánh với 30 người khỏe mạnh thuộc nhóm chứng. *Kết quả và kết luận:* Nồng độ haptoglobin ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối là  $0,92 \pm 0,48\text{g/l}$  và ở nhóm chứng là  $1,38 \pm 0,48\text{g/l}$ . Sự khác biệt về nồng độ haptoglobin ở nhóm bệnh và nhóm chứng có ý nghĩa thống kê,  $p < 0,05$ . Có mối tương quan nghịch giữa nồng độ haptoglobin và nồng độ sắt huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối,  $p < 0,05$ .

*Từ khóa:* Haptoglobin, bệnh thận mạn giai đoạn cuối.

### Summary

*Objective:* To survey on plasma haptoglobin concentrations of end stage renal diseases. *Subject and method:* Prospective, descriptive. Cross-sectional study on concentration of plasma haptoglobin in 77 patients who with end stage renal disease compared with 30 healthy people as control group. *Result and conclusion:* Plasma haptoglobin levels in patients with end stage renal diseases were significantly different from those in the control group ( $0.92 \pm 0.48\text{g/l}$  and  $1.38 \pm 0.48\text{g/l}$ , respectively,  $p < 0.05$ ). There was less close inverse correlation between haptoglobin and iron concentrations in patients with end stage renal diseases,  $p < 0.05$ .

*Keywords:* Haptoglobin, end stage renal diseases (ESRD).

---

Ngày nhận bài: 12/8/2019, ngày chấp nhận đăng: 15/8/2019

Người phản hồi: Nguyễn Cẩm Thạch, Email: nguyencamthach1973@yahoo.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

## 1. Đặt vấn đề

Bệnh thận mạn là một vấn đề sức khỏe toàn cầu hiện đang được quan tâm trong y học vì tỷ lệ mới mắc và hiện mắc ngày càng gia tăng, tăng gánh nặng chi phí điều trị và chất lượng cuộc sống giảm. Ngày nay, cùng với sự phát triển vượt bậc của khoa học kỹ thuật, các biện pháp điều trị bảo tồn, các phương pháp điều trị thay thế thận suy đã được ứng dụng và thành công trong điều trị bệnh thận mạn. Bệnh nhân bệnh thận mạn ngày càng được chăm sóc tốt hơn về nhiều phương diện, tuổi thọ của bệnh nhân ngày càng được nâng cao và tiên lượng bệnh có cải thiện đáng kể. Tuy nhiên, tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối vẫn còn cao, trong đó đáng quan tâm nhất là tử vong do biến chứng tim mạch. Những yếu tố nguy cơ tim mạch truyền thống trong nghiên cứu Framingham như giới nam, hút thuốc lá, chủng tộc, đái tháo đường cũng được nhận thấy ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối nhưng chưa đủ giải thích tăng tỷ lệ tử vong do bệnh tim mạch ở nhóm bệnh nhân này. Vì vậy, các yếu tố nguy cơ không truyền thống như viêm và stress oxy hóa lại đóng vai trò quan trọng hơn. Các cytokin tiền viêm (IL6, TNF- $\alpha$ , CRP, haptoglobin, ferritin...) được xem là yếu tố chủ đạo trong mối liên quan giữa viêm và xơ vữa động mạch trong bệnh thận mạn giai đoạn cuối. Trên thế giới, nhiều nghiên cứu đã cho thấy vai trò của viêm, suy dinh dưỡng, xơ vữa động mạch và sự kết hợp của cả 3 thành tố liên quan mật thiết với các biến cố tim mạch, tần suất nhập viện và tử vong ở những bệnh nhân này. Đây là một vấn đề ngày càng được quan tâm nhằm giảm thiểu biến chứng và tỷ lệ tử vong ở bệnh nhân suy thận mạn. Tuy nhiên, hiện chưa có các đề tài nghiên cứu sâu về nồng độ haptoglobin và mối liên quan với các yếu tố khác trong bệnh thận mạn. Xuất phát từ các lý do trên, chúng tôi thực hiện đề tài "Khảo sát nồng độ haptoglobin huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108" với 2 mục tiêu: *Khảo sát nồng độ haptoglobin huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối.*

*Bước đầu tìm hiểu mối tương quan giữa nồng độ haptoglobin và sắt huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối.*

## 2. Đối tượng và phương pháp

### 2.1. Đối tượng

Nhóm chứng: 30 người khỏe mạnh, trên 18 tuổi, được lựa chọn một cách ngẫu nhiên khi khám sức khỏe định kỳ tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108, từ tháng 5/2019 đến tháng 7/2019.

Nhóm bệnh: Gồm 77 bệnh nhân được chẩn đoán bệnh thận mạn giai đoạn cuối, trên 18 tuổi, điều trị tại Khoa Thận và Lọc máu chu kì - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 từ ngày 01/05/2019 đến ngày 30/07/2019.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Bệnh nhân được chẩn đoán xác định bệnh thận mạn giai đoạn cuối tình nguyện tham gia nghiên cứu; có đầy đủ thông tin cần nghiên cứu trong bệnh án.

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân suy thận cấp, suy thận mạn giai đoạn cuối đã ghép thận, sau chạy thận nhân tạo, thủng phân phúc mạc, có bệnh nhiễm trùng, bệnh phối hợp (viêm hoặc suy gan, thiếu máu tan máu, phản ứng truyền máu, bệnh lý đường tiêu hóa), sử dụng thuốc làm ảnh hưởng đến nồng độ haptoglobin: Androgen, corticosteroid, thuốc tránh thai...

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Tiến cứu mô tả cắt ngang có so sánh với nhóm đối chứng.

#### 2.2.2. Tiêu chuẩn chẩn đoán xác định và giai đoạn của bệnh thận mạn

Các bệnh nhân được chẩn đoán theo tiêu chuẩn của Hội Thận Quốc gia Hoa Kỳ (National Kidney Foundation - NKF) năm 2002 và hướng dẫn của Hội đồng Cải thiện kết quả toàn cầu về bệnh thận (Kidney Disease Improving Global Outcome - KDIGO) năm 2012: Bệnh thận mạn là tình trạng tổn thương thận về cấu trúc hoặc chức năng, tồn tại trên 3 tháng, biểu hiện bởi albumin

niệu hoặc các bất thường về hình ảnh học hoặc suy giảm chức năng thận được xác định thông qua mức lọc cầu thận < 60ml/phút/1,73m<sup>2</sup>. Dựa vào mức lọc cầu thận (MLCT) bằng hệ số thanh

thải creatinin ước đoán, Hội Thận Quốc gia Hoa Kỳ năm 2002 đã chia bệnh thận mạn thành 5 giai đoạn:

**Bảng 1. Các giai đoạn của bệnh thận mạn**

Các giai đoạn	Mô tả	Mức lọc cầu thận (ml/phút/1,73m <sup>2</sup> )
1	Tổn thương thận với mức lọc cầu thận bình thường hoặc tăng	≥ 90
2	Tổn thương thận với mức lọc cầu thận giảm nhẹ	60 - 90
3	Giảm mức lọc cầu thận trung bình	30 - 59
4	Giảm mức lọc cầu thận nặng	15 - 29
5	Bệnh thận mạn giai đoạn cuối	< 15 hoặc điều trị thay thế thận

### 2.2.3. Xét nghiệm haptoglobin

Nồng độ haptoglobin được xác định theo phương pháp miễn dịch đo độ đục trên máy sinh hóa AU 5800 của hãng Beckman Coulter (Mỹ) tại Khoa Sinh hóa - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108. Khoảng tham chiếu 0,3 - 2,0g/l.

### 2.2.4. Xét nghiệm sắt

Nồng độ sắt được xác định theo phương pháp đo quang trên máy sinh hóa AU 5800 của

hãng Beckmancoulter (Mỹ) tại Khoa Sinh hóa - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

Khoảng tham chiếu: Nam 12,5 - 32,2μmo/l, nữ: 10,7 - 32,2μmo/l.

### 2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích và xử lý bằng theo phương pháp thống kê y học trên phần mềm SPSS 20.0.

## 3. Kết quả

### 3.1. Đặc điểm chung của nhóm bệnh nhân bệnh thận mạn

#### 3.1.1. Đặc điểm về giới

**Bảng 2. Đặc điểm về giới tính của nhóm bệnh thận mạn**

Giới	Nhóm chứng (n = 30)		Nhóm bệnh (n = 77)		p
	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	
Nam	18	60	49	63,6	>0,05
Nữ	12	40	28	36,4	>0,05
<b>Tổng</b>	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>77</b>	<b>100</b>	

*Nhận xét:* Trong nhóm bệnh nam chiếm đa số với tỷ lệ 63,6%. Không có sự khác biệt về tỷ lệ nam hoặc nữ giữa nhóm chứng và nhóm bệnh với p>0,05.

**Bảng 3. Đặc điểm về tuổi của nhóm bệnh thận mạn**

Độ tuổi (năm)	Nhóm chứng (n = 30)		Nhóm bệnh (n = 77)		p
	Số lượng	Tỷ lệ %	Số lượng	Tỷ lệ %	

18 - 39	2	6,6	4	5,2	>0,05
40 - 59	8	26,6	20	26	>0,05
≥ 60	19	66,8	53	68,9	>0,05
Chung ( $\bar{X} \pm SD$ )	64,52 ± 11,12		65,27 ± 14,14		>0,05

**Nhận xét:** Tuổi trung bình của nhóm bệnh là 65,27 ± 14,14 tuổi, các bệnh nhân từ 60 tuổi trở lên chiếm phần lớn 68,9%, chỉ có 4/74 bệnh nhân trẻ < 40 tuổi. Không có sự khác biệt về tỷ lệ các nhóm tuổi giữa 2 nhóm chứng và nhóm bệnh.

### 3.2. Nồng độ haptoglobin ở nhóm bệnh thận mạn

**Bảng 4. Nồng độ haptoglobin huyết tương**

Thông số xét nghiệm	Nhóm chứng (n = 30)	Nhóm bệnh (n = 77)	p
Nồng độ haptoglobin (g/l) ( $\bar{X} \pm SD$ )	0,92 ± 0,48	1,38 ± 0,48	<0,05

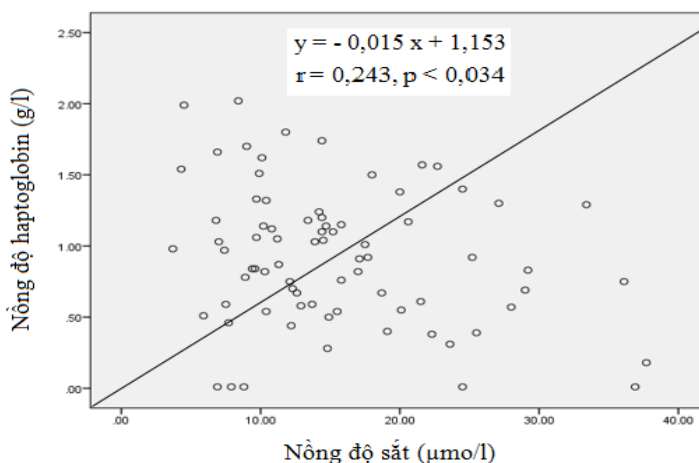
**Nhận xét:** Có sự khác biệt về nồng độ haptoglobin giữa nhóm chứng (1,38 ± 0,48g/l) và nhóm bệnh (0,92 ± 0,48g/l) với p<0,05.

### 3.3. Mối tương quan giữa nồng độ haptoglobin và sắt huyết tương ở bệnh nhân thận mạn giai đoạn cuối

**Bảng 5. Nồng độ sắt huyết tương bệnh nhân thận mạn giai đoạn cuối**

Thông số xét nghiệm	Nhóm chứng (n = 30)	Nhóm bệnh (n = 77)	p
Nồng độ sắt ( $\mu\text{mol/l}$ ) $\bar{X} \pm SD$	16,64 ± 5,68	15,49 ± 7,87	>0,05
Tỷ lệ (%) bệnh nhân có nồng độ sắt huyết tương tăng so với khoảng tham chiếu	0	0	
Tỷ lệ (%) bệnh nhân có nồng độ sắt huyết tương giảm so với khoảng tham chiếu	0	40 (40,26%)	

**Nhận xét:** Không có sự khác biệt về nồng độ sắt huyết tương giữa nhóm chứng (16,64 ± 5,68) và nhóm nghiên cứu (15,49 ± 7,87). 40 bệnh nhân (tỷ lệ 40,26%) của nhóm bệnh có nồng độ sắt huyết tương giảm so với khoảng tham chiếu.



**Biểu đồ 1.** Mối tương quan giữa nồng độ haptoglobin và sắt huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận giai đoạn cuối

*Nhận xét:* Có mối tương quan tuyến tính nghịch giữa nồng độ haptoglobin và sắt huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối, hệ số tương quan  $r = -0,243$ ,  $p < 0,05$ .

#### 4. Bàn luận

##### 4.1. Đặc điểm chung của nhóm bệnh nhân bệnh thận mạn

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi trung bình của các bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối là  $65,27 \pm 14,14$  năm, hầu hết bệnh nhân nghiên cứu có tuổi từ 60 trở lên (68,9%). Nghiên cứu của tác giả Ngô Thị Khánh Trang (2017) trên 174 bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối có tuổi trung bình là  $48,11 \pm 15,10$  năm; nhóm tuổi từ 18 đến 39 chiếm 29,3%; nhóm từ 40 - 59 tuổi chiếm 42% và nhóm  $\geq 60$  tuổi chiếm 28,7% [1]. Tác giả Võ Tam và cộng sự (2015) khảo sát nồng độ haptoglobin trên 45 bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối thì có 56,7% bệnh nhân thuộc nhóm tuổi từ 40 đến 59, nhóm trên 60 tuổi chiếm 35,5% [3]. Kết quả nghiên cứu của các tác giả khác trên thế giới như: Zimmerman J và cộng sự (Đức): Tuổi trung bình của bệnh nhân là  $62,4 \pm 13,7$  [10], Wang AY (Hồng Kông): Tuổi trung bình của bệnh nhân là  $56 \pm 12$  [8]. Như vậy, trong đề tài của chúng tôi các bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối có tuổi trung bình là  $65,27 \pm 14,14$  tuổi, tương tự với tuổi trung bình trong báo cáo của Zimmerman J. Các tác giả trong và ngoài nước đều chỉ ra tỷ lệ nam và nữ mắc bệnh thận mạn gần tương đương nhau. Tỷ lệ nữ trong nghiên cứu của tác giả Khánh Trang là 52,3% [1], trong báo cáo của Võ Tam 51,2% bệnh nhân là nữ [3]. Tỷ lệ nam/nữ trong đề tài của chúng tôi tương đương với nghiên cứu của tác giả Lê Quốc Chiêu thực hiện trên 83 bệnh nhân suy thận mạn giai đoạn cuối có 78,3% là nam, 21,7% nữ [2].

##### 4.2. Xác định nồng độ haptoglobin ở nhóm bệnh thận mạn

Năm 2015 tác giả Nguyễn Tam nghiên cứu trên 45 bệnh nhân suy thận mạn giai đoạn cuối và 32 người khỏe mạnh, không suy gan, không suy thận. Kết quả: Nồng độ haptoglobin ở bệnh nhân suy thận giai đoạn cuối là  $1,85 \pm 1,19$ mg/l và ở nhóm chứng là  $1,36 \pm 0,64$ mg/l. Sự khác nhau về nồng độ haptoglobin ở hai nhóm có ý nghĩa thống kê [3]. Nghiên cứu của Lê Quốc Chiêu và cộng sự (2016) trên 83 bệnh nhân suy thận mạn giai đoạn cuối và 31 người bình thường cũng có kết quả tương tự: Nồng độ haptoglobin trung bình nhóm bệnh nhân ( $1,41 \pm 0,74$ g/l) cao hơn có ý nghĩa thống kê với nồng độ haptoglobin nhóm chứng ( $0,73 \pm 0,19$ g/l) với  $p < 0,01$  [2]. Trong nghiên cứu của chúng tôi: Nồng độ haptoglobin ở nhóm bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối ( $0,92 \pm 0,48$ g/l) thấp hơn nhóm chứng ( $1,38 \pm 0,48$ g/l) với  $p < 0,05$ .

Theo những nghiên cứu của các tác giả Pintera J (1968), Georgina G, Jan LC (2011), đều ghi nhận rằng haptoglobin là một polipeptid được sản xuất chủ yếu ở gan, gồm hai sợi  $\alpha$  và hai sợi  $\beta$ . Haptoglobin có chức năng như một chất chống oxy hóa nhờ khả năng kết hợp với hemoglobin, vì vậy nó ngăn ngừa sự oxy hóa các mô tổn thương do các hemoglobin tự do. Phức hợp haptoglobin-hemoglobin quay trở lại gan và các thành phần của phức hợp này (bao gồm sắt và hemoglobin) được tái sử dụng. Haptoglobin được giải phóng khỏi phức hợp sau 3 ngày, hemoglobin được chuyển hóa thành enzym. Thời gian nửa đời của haptoglobin trung bình khoảng 5,4 ngày. Khi một số lượng lớn hồng cầu bị phá hủy, tốc độ phá hủy haptoglobin ở gan sẽ cao hơn tốc độ tạo mới cũng ở gan của haptoglobin; vì vậy, nồng độ haptoglobin trong máu sẽ giảm đi [4], [6].

Như vậy, nồng độ haptoglobin máu bị giảm đi khi có tình trạng giảm tổng hợp protein này tại gan (trong trường hợp có bệnh lý tại gan), hay khi có tăng dị hóa haptoglobin (tình trạng tan máu). Trong trường hợp chức năng gan bình thường thì tình trạng tan máu trong lòng mạch gây giải phóng hemoglobin vào huyết tương và hình thành các phức hợp haptoglobin-hemoglobin.

#### **4.3. Nồng độ sắt huyết tương và mối tương quan với nồng độ haptoglobin ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối**

Thiếu sắt trên bệnh nhân bệnh thận mạn đã được nhiều tác giả đề cập tới, nghiên cứu của chúng tôi cũng cho kết quả tương đương với một số tác giả khác như Hoàng Trung Vinh và cộng sự năm 2005 cho thấy có 39,3% bệnh nhân suy thận mạn có giảm nồng độ sắt huyết tương. Tác giả Lã Việt Thắng, Nguyễn Văn Hùng năm 2011 báo cáo tỷ lệ bệnh nhân giảm sắt huyết thanh là 41,86%.

Báo cáo của tác giả Võ Tam cho biết có mối tương quan nghịch ít chặt chẽ giữa nồng độ haptoglobin và số lượng hồng cầu, hemoglobin ở bệnh nhân suy thận mạn giai đoạn cuối, nhưng không có mối tương quan giữa nồng độ haptoglobin và sắt huyết tương ở nhóm nghiên cứu [3]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, có mối tương quan nghịch giữa nồng độ haptoglobin và sắt huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối với  $p < 0,05$ .

Theo các tác giả Miederer (1969), Wassell J (2000), Van (2004) có nhiều bằng chứng chỉ ra vai trò bắt giữ hem của haptoglobin trong tình trạng tan huyết nói chung và tình trạng tan huyết ở bệnh thận nói riêng. Bình thường, khi hồng cầu bị phá hủy sẽ giải phóng hemoglobin tự do, sẽ bị đào thải qua thận, nó gây oxy hóa và làm tổn thương tế bào ống thận. Tuy nhiên, haptoglobin trong huyết tương sẽ liên kết với hemoglobin tự do giải phóng từ hồng cầu có ái lực cao và do đó ức chế hoạt động oxy hóa của nó. Sau đó, phức hợp haptoglobin-hemoglobin sẽ được loại bỏ

bởi hệ thống lưới nội mô. Trong quá trình liên kết với hemoglobin tự do, haptoglobin cô lập chất sắt trong hemoglobin, ngăn chặn vi khuẩn sử dụng sắt được hưởng lợi từ quá trình tán huyết. Haptoglobin đã phát triển thành protein pha cấp, do đó haptoglobin có vai trò bảo vệ thận [5], [7], [9].

#### **5. Kết luận**

Nghiên cứu trên 77 bệnh nhân suy thận mạn giai đoạn cuối, có so sánh với 30 người khỏe mạnh, chúng tôi rút ra kết luận sau:

Nồng độ haptoglobin huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối là  $0,92 \pm 0,48\text{g/l}$  và ở nhóm người bình thường là  $1,38 \pm 0,48\text{g/l}$ , sự khác nhau về nồng độ haptoglobin giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Có mối tương quan nghịch giữa nồng độ haptoglobin và sắt huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối,  $p < 0,05$ .

#### *Kiến nghị*

Xem xét thực hiện xét nghiệm nồng độ haptoglobin trong quá trình theo dõi và điều trị cho các bệnh nhân bệnh thận mạn giai đoạn cuối tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Ngô Thị Khánh Trang (2017) *Nghiên cứu đặc điểm và giá trị tiên lượng của hội chứng suy dinh dưỡng - viêm - xơ vữa ở bệnh nhân thận mạn giai đoạn cuối*. Luận án Tiến sĩ, Trường Đại học Y Dược Huế.
2. Lê Quốc Chiêu, Nguyễn Hữu Dũng, Ngô Tuấn Minh, Lê Việt Thắng (2016) *Khảo sát nồng độ haptoglobin huyết tương ở bệnh nhân bệnh thận mạn tính giai đoạn cuối*. Tạp chí Y Dược lâm sàng 108, tập 11- số 1, tr. 152-159.
3. Võ Tam, Trần Đức Sáo (2011) *Khảo sát nồng độ haptoglobin huyết thanh ở bệnh nhân suy thận mạn giai đoạn cuối*. Tạp chí Y Dược học, Trường Đại học Y Dược Huế, tr. 759-764.
4. Pintera J (1968) *The protective influence of haptoglobin on hemoglobinuric kidney. I.*

- Biochemical and macroscopic observations.* Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch 90(1): 82-91.
5. Miederer SE, Hotz J (1969) *Pathogenesis of kidney hemolysis.* Bruns Beitr Klin Chir (in German) 217(7): 661-665.
  6. Georgina G, Jan LC (2011) *Haptoglobin function and regulation in autoimmune diseases.* Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase Protein 3: 229-246.
  7. Van VH, Langlois M, Delanghe J (2004) *Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease.* Clin.Chim.Acta. 345: 35-42.
  8. Wang AY, Wang M, Lam CW et al (2011) *Heart failure in longterm peritoneal dialysis patients: A 4-year prospective analysis.* Clinical Journal of the American Society of Nephrology 6(4): 805-812.
  9. Wassell J (2000) *Haptoglobin: Function and polymorphism.* Clinical Laboratory 46(11-12): 547-552.
  10. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C (1999) *Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients.* Kidney International 55: 648-658.