مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره پانزدهم، شمارهٔ ۳، اردیبهشت ۱۳۹۲، صفحه ۶۹-۶۵

مقایسه بیان ki67 در اپیتلیوم پولیپ و مخاط ملتهب غیر پولیپوئید بینی

مرجان حشمتی(PhD)[۱]، محمدرضا جلالی ندوشن(MD)[*۱]، علی دواتی(MD)[۲]، سمیرا کاظم(MD)[۳]

۱- گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشگاه شاهد
۲- گروه پزشکی اجتماعی، دانشگاه شاهد
۳- دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

دریافت: ۹۱/۲/۱۹، اصلاح: ۹۱/۶/۸، پذیرش: ۹۱/۸/۱۷

خلاصه

سابقه و هدف: پولیپهای بینی ضایعات غیر طبیعی هستند که از هر قسمتی از مخاط بینی یا سینوسهای اطراف بینی منشا می‌گیرند و در اثر التهاب مزمن غشاهای مخاطی بینی و سینوسها بوجود می‌آیند. این مطالعه به منظور مقایسه بیان Ki67 در اپیتلیوم پولیپ و مخاط ملتهب غیر پولیپوئید بینی انجام شد.

مواد و روشها: این مطالعه مقطعی بر روی ۸۸ نمونه بیمار مبتلا به پولیپ بینی و ۱۲ نمونه مخاط ملتهب غیر پولیپوئید در بیماران با سینوزیت مزمن که به بیمارستان شهید مصطفی خمینی تهران مراجعه کرده بودند، انجام شد. نمونه ها به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی بادی منوکلونال برای بررسی بیان ki67 رنگ آمیزی شدند و درصد رنگ پذیری نمونه های بافتی از نظر ki67 به صورت درجه ۱ (ضعیف)، درجه ۲ (متوسط) و درجه ۳ (شدید) بر اساس در صد سلولهای مثبت تعیین شد و در دو گروه مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته ها: در گروه پولیپ ۱۴ نمونه (۱۵/۹٪) دارای درجه رنگ پذیری یک، ۵۱ نمونه (۵۸٪) درجه دو و۲۳ نمونه (۲۶/۱٪) درجه سه بودند. در گروه سینوزیت ۸ نمونه (۶۶/۷٪) دارای درجه رنگ پذیری یک و ۴ نمونه (۳۳/۳٪) درجه دو بودند و هیچ کدام درجه سه نبودند. بین دو گروه مورد و شاهد از نظر درصد سلولهای ki67 مثبت ارتباط معنی داری وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه گیری: ki67 به عنوان یک آنتی‌ژن تکثیری در سلول اپیتلیوم پولیپ بینی به مراتب بارزتر از مخاط ملتهب غیرپولیپوییید می باشد و بیان آن می تواند در ایجاد پولیپ موثر باشد.

واژه های کلیدی: پولیپ بینی، سینوزیت، Ki67.

مقدمه

پولیپ‌های بینی ضایعات غیر طبیعی هستند که از هر قسمتی از مخاط بینی یا سینوسهای اطراف بینی منشاء می‌گیرند. در واقع پولیپ‌ها نتیجه نهایی پروسه‌های مختلف بیماری در حفرات بینی هستند. آنها در اثر التهاب مزمن غشاهای مخاطی بینی و سینوسها بوجود می‌آیند (۳-۱). پولیپها بیشتر با بیماریهای غیر آلرژیک نسبت به بیماریهای آلرژیک مرتبط هستند، بعضی محققان معتقدند که پولیپها رشد رو به خارج مخاط طبیعی بینی یا سینوس هستند که با استرومای ادماتو پر می‌شوند، برخی معتقدند که پولیپها ضایعات مشخصی هستند که از مخاط منشاء می‌گیرند (۱). پولیپهای بینی در بیماران با آسم غیر آلرژیک (۱۳٪) شایع‌تر از آسم آلرژیک (۵٪) بوده و فقط ۰/۵٪ از ۳۰۰۰ فرد آتوپیک پولیپ بینی دارند (۴). میزان بروز آن در کل جهان مشابه بروز در ایالات متحده است. میزان ناتوانی در ارتباط با پولیپ بینی معمولاً در اثر تغییر کیفیت زندگی، انسداد بینی، آنوسمی، سینوزیت مزمن، سردرد، خرخر، ترشح پشت بینی و رینوره است. با وجودیکه مطالعات متعددی بر روی پولیپهای بینی صورت گرفته، مکانیسم ایجاد و رشد آنها هنوز به طور کامل مشخص نشده است (۳-۱). مطالعات اخیر به بررسی مارکرهای تکثیر اپیتلیال در پولیپهای بینی پرداخته‌اند. یکی از مارکرهای تکثیر اپیتلیال که در این مطالعه به بررسی آن پرداخته میشود Ki67 می باشد. ki67 یک آنتی‌ژن تکثیری مرتبط با هسته است که توسط سلولهای در حال تکثیر (مراحل سلولی G_2، G_1، M و S) نه در حال استراحت (G_0) بیان می‌شود (۵). در مطالعه Kösem گزارش شده که فاکتور تکثیری Ki67 در پولیپهای عودکننده بینی نسبت به موارد بدون عود دارای تفاوت معنی دار بالاتر بوده است (۶). در تحقیق دیگری که توسط Aydin و همکارانش انجام شده ارتباط مسقیمی بین اندازه پولیپ که توسط توموگرافی کامپیوتری تعیین شده بود و

▣ این مقاله حاصل پایان نامه سمیرا کاظم دانشجوی پزشکی دانشگاه شاهد می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید عبداله زاده، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تلفن: ۸۸۹۶۳۷۶۲-۰۲۱
e-mail: jalalinadooshan@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.9.6]

فاکتور تکثیری Ki67 وجود داشت (۷). در مطالعه‌ای که توسط Mrówka-Kata و همکارانش صورت گرفت، ارزیابی ایمونوهیستوشیمی ملکول ki67 در بافت پولیپ بینی بود که هیچ تفاوت معنی‌داری از نظر آماری بین درصد سلولهای مثبت در پولیپهای بینی و مخاط طبیعی بینی وجود نداشت (۸).

با توجه به اینکه پولیپ حفرات بینی و سینوسها ضایعاتی عود کننده بوده که سبب جراحی‌های مکرر و صرف هزینه‌های زیاد می‌شود و از طرفی تحقیقات در مورد نقش عوامل مختلف در ایجاد پولیپ بینی و سینوسها هنوز در مراحل ابتدایی است و از جمله عوامل موثر فاکتورهای تکثیری هستند. این مطالعه با هدف مقایسه بیان ki67 در پولیپهای بینی و مخاط غیر پولیپوید بینی جهت بررسی اختلاف در بیان این فاکتور تکثیری انجام گردید.

مواد و روشها

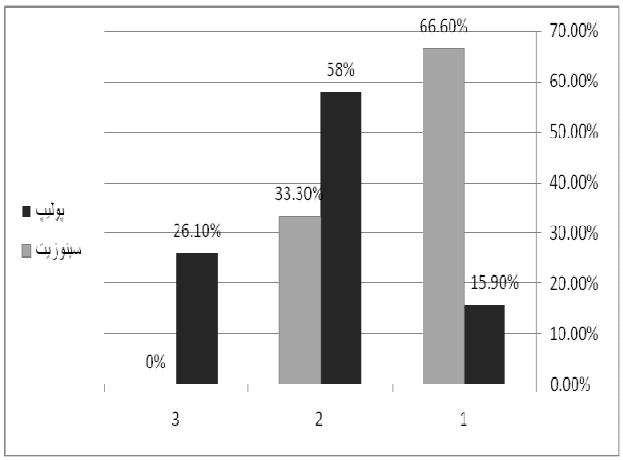
این مطالعه مقطعی بر روی کلیه بیماران مراجعه کننده شامل ۸۸ بیمار مبتلا به پولیپ بینی و ۱۲ نمونه مخاط ملتهب غیر پولیپوئید از بیمارانی که به دلیل سینوزیت مزمن تحت عمل جراحی قرار گرفته و بین سالهای ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۸ به بیمارستان شهید مصطفی خمینی مراجعه کرده بودند، صورت گرفت. اطلاعات دموگرافیک مربوط به سن و جنس از پرونده بیماران استخراج شد. بلوکهای پارافینی نمونه ها از بایگانی استخراج گردید. سپس از هر بلوک دو لام با برش ۳ میکرونی تهیه شد. یک لام با روش روتین هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شد، لام دیگر به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی بادی منوکلونال طبق دستورالعمل کارخانه کیت (Novocastra – انگلستان) جهت تشخیص بیان Ki67 رنگ آمیزی گردید و بوسیله میکروسکوپ نوری در ۵۰۰ سلول اپیتلیوم شمارش شده و درصد سلولهای مثبت تعیین گردید. همچنین در ۱۲ نمونه مخاط طبیعی در بیمارانی که پولیپ نداشتند و فقط به علت سینوزیت مزمن تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند شمارش از نظر ki67 مشابه نمونه‌های پولیپ صورت گرفت و درصد سلولهای مثبت تعیین شد. درصد رنگ پذیری نمونه های بافتی از نظر ki67 به صورت درجه ۱ (ضعیف)، درجه ۲ (متوسط) و درجه ۳ (شدید) تعیین شد. درجه ۱ به معنای (۱۲-۰) درصد، درجه ۲ (۲۷-۱۳) درصد و درجه ۳ (۱۰۰-۲۸) درصد می باشد (۹).

پس از مشاهده لامهای آسیب‌شناسی و تکمیل فرمهای اطلاعاتی، اطلاعات موجود کد گذاری شده و توسط آزمونهای کای‌دو، کروس کال والیس و اسپیرمن، تجزیه و تحلیل صورت گرفت و $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در گروه مورد از مجموع ۸۸ نفر، ۵۶ نفر مرد (۶۳/۶٪) و ۳۲ نفر زن (۳۶/۴٪) بودند. در گروه شاهد نیز از مجموع ۱۲ نفر، ۶ نفر مرد و ۶ نفر زن بودند. در گروه مورد کمترین سن ۱۹ سال و بیشترین ۸۸ سال بود. در گروه شاهد کمترین سن ۲۳ سال و بیشترین ۶۱ سال بود. اختلاف معنی داری بین دو گروه مورد و شاهد از نظر درصد سلولهای ki67 مثبت مشاهده گردید ($p<0/001$). به این معنی که بیان ki67 در بیمارانی که پولیپ داشتند نسبت به مخاط ملتهب غیر پولیپوئید بینی بالاتر است (نمودار ۱).

در بررسی ارتباط میان فاکتورهای مختلف از جمله سن و جنس با درجه رنگ‌پذیری از نظر ki67 بین درجه مثبت شدن نمونه ها و جنس ارتباط معنی داری یافت نشد. نمونه بافتی ۸ نفر از مبتلایان سینوزیت شامل ۶ مرد و ۲ زن و ۱۴ نمونه پولیپ شامل نمونه ۸ مرد و۶ زن درجه رنگ پذیری ۱ با مارکر ki67 داشت. ۵۱ نمونه پولیپ شامل ۳۴ نمونه از بیماران مرد و ۱۷ نمونه از بیماران زن و فقط ۴ نمونه سینوزیت از بیماران زن درجه ۲ رنگ پذیری را بخود اختصاص دادند. در گروه ۳ رنگ پذیری ki67، ۲۳ نمونه پولیپ شامل ۱۴ نمونه از مردان و ۹ نمونه از زنان قرار گرفت. هیچکدام از نمونه های سینوزیت درجه ۳ رنگ پذیری نداشتند. همچنین بین جنس و درصد مثبت شدن نمونه‌ها از نظر ki67 ارتباط معنی‌داری یافت نشد به این معنی که جنسیت تاثیری در مثبت شدن یا نشدن نمونه‌ها ندارد. بین سن و درجه مثبت شدن نمونه‌ها ارتباط معنی‌داری یافت نشد همچنین بین سن و درصد مثبت شدن نمونه‌ها همبستگی معنی‌داری یافت نشد ($r=0/12$ ،$p=0/38$).



نمودار ۱. درجه رنگ‌پذیری نمونه‌های بافتی از نظر ki67 در هر دو گروه سینوزیت و پولیپ

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بین دو گروه مبتلا به سینوزیت مزمن و پولیپ بینی از نظر بیان ki67 تفاوت معنی داری وجود دارد ولی بین جنس و سن افراد و درصد سلولهای مثبت از نظر ki67 ارتباط معنی داری وجود نداشت. De Gabory و همکارانش مطالعه‌ای را بر روی ۳ مارکر تکثیر و دژنراسیون CEA، ki67 و UEA-I در پاپیلومای معکوس انجام دادند که در مطالعه آنان نیز بیان ki67 در گروه مورد که شامل ضایعات دیسپلاستیک و دژنره بود، نسبت به گروه شاهد واضحا افزایش یافته بود (۱۰). تفاوت مطالعه آنان با مطالعه ما این بود که ما فقط پولیپ را در نظر گرفته و غیر از ki67 مارکرهای تکثیری دیگر را بررسی نکردیم. Mumbuc و همکارانش واکنش ایمنی PCNA (آنتی ژن هسته‌ای تکثیر سلولی)، ki67 و p53 را در پولیپ بینی بررسی کردند که این واکنش ایمنی با شمارش هسته های رنگ آمیزی شده حداقل ۱۰۰۰ سلول اپیتلیال به طور کمی ارزیابی شد که درصد سلولهای رنگ آمیزی شده به روش ایمنی برای PCNA در پولیپهای بینی ۱۴/۷۳٪، برای ki67، ۲/۶۴٪ و برای p53 در ۲ بیمار با پولیپ بینی ۹/۵٪ بود که فقط نشان داد تکثیر سلول اپیتلیال یک مکانیسم مهم در ایجاد پولیپ بینی می باشد (۱۱).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.9.6]

نتایج این مطالعه اگرچه مشابه مطالعه ما می‌باشد، ولی ما p53 و PCNA را بررسی نکردیم.

Garavello و همکارانش مطالعه ای را درباره بیان پروتئینهای تنظیم کننده سیکل سلولی و آنالیز آپوپتوز در مخاط طبیعی بینی و پولیپهای بینی انجام دادند که یک نسبت بیشتری از سلولهای در حال تکثیر را در اپیتلیوم پوشاننده پولیپهای بینی در مقایسه با مخاط طبیعی در رنگ آمیزی ki67 پیدا کردند. همچنین یک بیان بالای p53، MDM2 و Bcl2 و افزایش آپوپتوز نیز در پولیپها در مقایسه با مخاط طبیعی مشاهده شد و نتیجه گرفتند که p53 که سیستم کنترل کننده پایه پیشرفت سیکل سلولی می باشد، در پولیپهای بینی تغییر می کند (۱۲). در مطالعه ما p53 مورد بررسی قرار نگرفت ولی نتایجی که در مورد ki67 بدست آمد، مشابه این مطالعه می‌باشد.

در مطالعه‌ای دیگر که توسط Ikegawa و همکارانش صورت گرفت نیز p53 و ki67 بوسیله تکنیک ایمونوهیستوشیمی در پاپیلومای معکوس و پولیپهای بینی مورد بررسی قرار گرفتند. در هر دو پولیپهای بینی و پاپیلومای معکوس بیان p53 از نظر آماری با اندکس ki67 مرتبط بود. این یافته ها نشان دهنده ارتباط بین اختلال عملکرد p53 در رشد بیش از حد سلولهای اپیتلیال در پولیپهای بینی و پاپیلومای معکوس است. در مطالعه آنان بیان p53 در ۷۵٪ موارد پاپیلومای معکوس و ۴۲/۹٪ موارد پولیپ بینی مشخص شد. هیچ نوع تفاوت واضحی در امتیازات p53 و اندکس ki67 بین پولیپها و پاپیلومای معکوس وجود نداشت ، اما به هرحال آنان به این نتیجه رسیدند که به نظر می‌رسد الگوی توزیع سلولهای مثبت از نظر p53 در پاپیلومای معکوس متفاوت از موارد پولیپ باشد (۱۳). این مطالعه و نتایج آن اگرچه مشابه مطالعه ما می باشد ولی تفاوت مطالعه ما در عدم بررسی پاپیلوما معکوس بوده و اینکه ما فقط ki67 را در پولیپ بینی ارزیابی کردیم.

مطالعه‌ای که توسط Tryka و همکارانش صورت گرفت مشابه مطالعاتی است که تاکنون بیان شده، یعنی آنان تکثیر سلول اپیتلیال را در پولیپ بینی بررسی کردند. مطالعه آنها مقادیر واضحا بالای اندکس ki67 را در پولیپهای بینی نسبت به مخاط طبیعی بینی نشان داد (۱۴)، که مشابه نتایج مطالعه ما می‌باشد. Coste و همکارانش نیز یک مطالعه فلوسیتومتری و ایمونوهیستوشیمی را درباره تکثیر سلولهای اپیتلیال در پولیپهای بینی انجام دادند. در مطالعه آنها درصد سلولهای موجود در فاز S، سلولهای نشاندار ki67، سلولهای نشاندار با ki67 در فاز s و اندکس فلورسانس سبز به طور واضحی در پولیپهای بینی نسبت به مخاط طبیعی بالاتر بود که نتایج آن مشابه مطالعه ما بوده و نشان می‌دهد که تکثیر سلول اپیتلیال که در پولیپهای بینی افزایش یافته است، می‌تواند یک نقش مهمی را در پاتوژنز پولیپوز بینی و ارتباط آن با التهاب بازی کند (۱۵). در مطالعه‌ای که توسط Mrówka-Kata و همکارانش صورت گرفت، هیچ تفاوت معنی‌داری از نظر آماری بین درصد سلولهای مثبت در پولیپهای بینی و مخاط طبیعی بینی وجود نداشت که این نتیجه درست عکس نتیجه ای است که در مطالعه ما بدست آمد (۸). در کل، روش بررسی ki67 در مطالعه ما همانند بسیاری از مطالعات انجام شده در این زمینه به روش ایمونوهیستوشیمی بود. عمده مزیت این مطالعه نسبت به مطالعات قبلی این است که جمعیت مورد مطالعه بطور غیرانتخابی و در یک مرکز و با روش مشابه و در یک زمان انجام شد، بدین ترتیب عوامل مداخله‌گر از جمله تفاوت در کیت رنگ آمیزی و روش کار حذف شد. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه ما و همچنین مطالعات قبلی به نظر می‌رسد که نقش ki67 به عنوان یک آنتی‌ژن تکثیری در سلول اپیتلیوم پولیپ بینی به مراتب بارزتر از مخاط التهابی بدون تغییرات پولیپوید می‌باشد و باید توجه خاصی را به این مارکر به عنوان عامل موثر در تکثیر سلول اپیتلیال جلب نماید. ولی با این مطالعه در مورد نقش آن در پاتوژنز پولیپ نمی توان نتیجه قطعی گرفت و به نظر می‌رسد انجام مطالعات کاملتر با حجم نمونه بیشتر می‌تواند نتایج بهتری را نشان دهد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه شاهد به دلیل حمایت مالی از تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.9.6]

Comparison of Ki67 Expression in Nasal Polyp Epithelium and Non-Polypoid Nasal Inflamed Mucosa

M. Heshmati (PhD) [1], M.R. Jalali Nadoushan (MD) [1*], A. Davati (MD) [2], S. Kazem (MD) [3]

1. Department of Pathology and Anatomy, Shahed University, Tehran, Iran
2. Department of Social Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
4. Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

J Babol Univ Med Sci; 15(3); May 2013; pp: 65-69
Received: May 8th 2012, Revised: Aug 29th 2012, Accepted: Nov 7th 2012.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Nasal polyps are abnormal growths from the lining of the nose or paranasal sinuses. They occur due to chronic inflammation of the mucous membranes of the nose and sinuses. In this study, we evaluated Ki-67 expression in nasal polyp epithelium and non-polypoid nasal inflamed mucosa.

METHODS: This cross-sectional study with descriptive and analytical aspects were done on 88 nasal polyps and 12 non-polypoid nasal inflamed mucosa in Shahid Mostafa Khomeini hospital, Tehran-Iran. One tissue section was stained with monoclonal Ki67 antibody by immune histochemistry method and the percentage of ki67 staining tissue samples for grade 1 (weak), grade 2 (moderate) and grade 3 (severe) based on the percentage of positive cells was determined and compared in two groups.

FINDINGS: In case group, 14 (15.9%), 51 (58%), and 23 (26.1%) showed I, II, and III staining grade, respectively. In sinusitis group, 8 (66.7%) and 4 (33.3%) showed I, II staining grade, respectively. There was significant statistical correlation between the two groups regarding the percentage of ki67-positive cells ($p<0.001$).

CONCLUSION: It seems ki67 expression is greater in epithelial cells of nasal polyps than non-polypoid nasal inflamed mucosa. Ki67 expression can be effective in causing polyp.

KEY WORDS: *Nasal polyp, Sinusitis, Ki-67.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Faculty of Medicine, Shahed University, Keshavarz Blvd, Shahid Abdolallahzadeh St.,Tehran, Iran
Tel: +98 21 88963762
E-mail: jalalinadooshan@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.9.6]

References

1.Lavezzi A, Mantovanni M, Cazzullo A, Turconi P, Matturri L. P53over expression and its correlation with PCNA index in nasal polyps. Rhinology 1993;37(4):160-3.

2.Welkoborsky HJ, Portmann K, Hoffmann F, Jacob R, Mann WJ, Amedee RG. Proliferative activity and cytometric characteristics polyps of the nasal cavity and paranasal sinuses. Am J Rhinal 2000;14(2):87-91.

3.Coste A, Rateau JG, Roudot- Thoraval F, et al. Increased epithelial cell proliferation in nasal polyps. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1996;122(4):432-6.

4.Pawlicza R, Lewandowska A, Kowalski M. Pathogenesis of nasal polyps: an update. Curr Allergy Asthma Rep 2005; 5(6):463-71.

5.Jaffe ES. Surgical pathology of the lymph nodes and related organs. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders 1995; pp: 253-5.

6.Kösem M, Bulut G, Kaya Z. Analysis of Ki-67 immunoreactivity in recurring and nonrecurring nasal polyps. J Otolaryngol Head Neck Surg 2010;39(4):464-7.

7.Aydin S, Sanli A, Tezer I, Hardal U, Barişik NO. The comparison of the expansion of polyps according to the Ki-67 and computedtomography scores. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg 2009;19(4):179-83.

8.Mrowka Kata K, Namystowski G, Steplewska K, Gabriel A, Wysocka A. Immunohistochemical assessment of molecule ki67 in nasal polyps tissue. Otolaryngol Pol 2007;61(6):958-61.

9.Jalali Nadoushan MR, Neisani E, Karbassi M. Correlation of ki67-positivity in tumoral cells` percentage with effective factors on prognosis in primary breast cancer. Res J Biol Sci 2007;2(3):326-8.

10.De Gabory L, Deminiere C, Stoll D. Immunohistochemistry expression of 3 markers (CEA, UEA-I and ki67) in nasal inverted papillomas. Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord) 2008;129(3):159-65.

11.Mumbuc S, Karakok M, Baglam T, Karatas E, Duruca C, Kibar Y. Immunohistochemical analysis of PCNA, ki67 and P53 in nasal polyposis and sinonasal inverted papillomas. J Int Med Res 2007;35(2):237-41.

12.Garavello W, Vingano P, Ramagnoli M, et al. Expression of cell cycle regulatory proteins and analysis of apoptpsis in normal nasal mucosa and in nasal polyps. Am J Rhinol 2005;19(6):549-53.

13.Ikegawa K, Matsukuma S. Immunohistochemical study of P53 and ki67 in inverted papillomas and nasal polyps arising from nasal or paranasal regions. Rinsho Byori 2005;53(6):499-503.

14.Tryka E, Skomra D, Klatka J, Gieroba R, Olszanski W. Epithelial cell proliferation in nasal polyps. Otolaryngol Pol 2005;59(4):523-6.

15.Coste A, Rateau JG, Bernaudin JF, Peyneqre R, Escudier E. Nasal polyposis pathogenesis: a flow cytometric and immunohistochemical study of epithelial cell proliferation. Acta Otolaryngol 1996;116(5):755-61.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.3.9.6]