

Nilotinib w leczeniu chorych na przewlekłą białaczkę szpikową z hepatotoksycznością po imatynibie

Nilotinib in patients with chronic myelogenous leukemia with hepatotoxicity after imatinib

Rafał Becht

Klinika Hematologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

Streszczenie

W leczeniu chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (CML) stosuje się terapię celowaną inhibitorami kinaz tyrozynowych (TKI). Obecnie w leczeniu pierwszej linii możliwe jest zastosowanie jednego z trzech dostępnych TKI: imatynibu (IM), nilotinibu, dazatynibu. Najczęściej jednak nadal stosuje się IM. U niektórych pacjentów lek ten może być przyczyną ciężkiego uszkodzenia wątroby. Takie zdarzenie występuje u mniej niż 5% chorych. W pracy przedstawiono opisy 2 przypadków chorych z hepatotoksycznością po IM. U 2 pacjentek było to powodem przerwania leczenia IM. W dalszym leczeniu zastosowano nilotinib (NILO). Leczenie za pomocą NILO było dobrze tolerowane i nie obserwowano nawrotu hepatotoksyczności.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka szpikowa, imatynib, nilotinib, hepatotoksyczność

Hematologia 2013; 4, supl. B: 12–16

Abstract

In the treatment of patients with chronic myelogenous leukemia (CML) targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKI) is used. Presently, treatment of the first line is based on the three available TKI, including imatinib, nilotinib or dasatinib. However, imatinib (IM) is the most widely used in this clinical setting. In some patients, it can cause severe liver damage. This event occurs in less than 5% of patients. This paper presents a description of 2 clinical cases of hepatotoxicity after IM. In 2 patients, this was the reason of withdrawing the drug and nilotinib was introduced. The therapy was well tolerated and there was no recurrence of hepatotoxicity.

Key words: chronic myelogenous leukemia, imatinib, nilotinib, hepatotoxicity

Hematologia 2013; 4, supl. B: 12–16

Wprowadzenie

Przewlekła białaczka szpikowa (CML, *chronic myelogenous leukemia*) jest zaliczana do nowotworów mieloproliferacyjnych (MPN, *myeloproliferative neoplasms*). Istota tej choroby to klonalny rozrost wielopotencjalnej komórki macierzystej szpiku kostnego (BM, *bone marrow*). Charakterystycznym zaburzeniem cytogenetycznym jest translokacja

genu *ABL* z chromosomu 9 na 22 t(9;22)(q34;q11) — tak zwany chromosom *Philadelphia* (Ph), która prowadzi do utworzenia genu fuzyjnego (*BCR-ABL1*) kodującego onkoproteinę (p210, p190 lub rzadziej p230) znajdującą się w cytoplazmie komórek i wykazującą aktywność kinazy tyrozynowej aktywowanej w sposób konstytutywny [1].

Zapadalność na CML waha się w granicach 10–15 przypadków na 100 tys. na rok [2]. Mediana

Adres do korespondencji: Rafał Becht, Klinika Hematologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny, ul. Unii Lubelskiej 1, 71–252 Szczecin, e-mail: rbecht@poczta.onet.pl

wieku w momencie rozpoznania w krajach europejskich to 60–65 lat. Postęp w leczeniu CML wiąże się z wprowadzeniem terapii celowanej inhibitorami kinaz tyrozynowych (TKI, *tyrosine kinase inhibitor*).

Imatynib (IM), pozytywnie zaopiniowany w 2001 roku przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*), jest „złotym standardem” w leczeniu chorych na CML. Obecnie w leczeniu pierwszej linii u chorych na CML oprócz IM są zarejestrowane dwa inne leki — nilotynib (NILO) i dazatynib (DAZA) — jednak IM pozostaje najczęściej wybieranym lekiem u nowo zdiagnozowanych chorych [3].

Imatynib hamuje aktywność kinazową wszystkich form kinazy ABL1 (c-ABL, v-ABL, BCR-ABL1, TEL-ABL), a także kinazy c-KIT, będącej receptorem dla czynnika wzrostowego komórek macierzystych (SCF, *stem-cell factor*) oraz receptora płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR *platelet-derived growth factor receptor*) [3]. Lek ten jest wskazany w leczeniu fazy przewlekłej, akceleracji i kryzy blastycznej w przebiegu CML z obecnym chromosomem Ph, jak również u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL, *acute lymphoblastic leukemia*) z obecnością chromosomu Ph, pacjentów z zespołami mielodysplastycznymi/mieloproliferacyjnymi związanymi z rearanżacją genu receptora PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*), pacjentów z zespołem hipereozynofilowym (HES, *hypereosinophilic syndrome*). Imatynib jest także zarejestrowany w leczeniu pacjentów z nowotworami podścieliskowymi przewodu pokarmowego (GIST, *gastrointestinal stromal tumors*).

Jak każdy lek stosowany w terapii przeciwnowotworowej, IM również cechuje się profilem toksyczności hematologicznej i pozahematologicznej. Jedno z rzadziej występujących powikłań po IM to hepatotoksyczność. W badaniach klinicznych I–III fazy 2. stopień toksyczności według klasyfikacji CTC (*Common Toxicity Criteria*) dotyczący nasilenia aktywności enzymów wątrobowych (aminotransferaz) stwierdzano u około 8% pacjentów, natomiast stopień 3.–4. według CTC w zakresie aktywności aminotransferaz występował u 1–5,1%, z kolei 3.–4. stopień według CTC w odniesieniu do podwyższenia stężenia bilirubiny całkowitej stwierdzano u 0,4–3,5% pacjentów [4–6].

W pracy przedstawiono opisy 2 przypadków klinicznych chorych na CML w fazie przewlekłej, leczonych IM w dawce 400 mg/dobę, u których w trakcie leczenia doszło do toksycznego uszkodzenia wątroby. Powikłanie to było powodem przerwania leczenia; podjęto potem ponowną próbę wzno-

wienia terapii IM, której efekt okazał się jednak niezadawalający. Ostatecznie chorym zmieniono leczenie na TKI drugiej generacji (NILO).

Przypadek 1.

Chora, 75-letnia emerytka, została przyjęta pod koniec czerwca 2011 roku do Kliniki Hematologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego z powodu stwierdzonej w morfologii krwi zwiększonej leukocytozy oraz uwidocznionej w badaniu ultrasonograficznym (USG) jamy brzusznej splenomegalii. Dodatkowo pacjentka podawała dolegliwości bólowe kończyn dolnych i górnych w zakresie stawów i mięśni, nasilającą się potliwość nocną oraz osłabienie. Wymienione wyżej dolegliwości pojawiły się około 3 miesiące wcześniej. Na podstawie objawów i wyników badań dokonano wstępnego rozpoznania MPN pod postacią CML. Przy przyjęciu do Kliniki stan pacjentki był dobry; była wydolna oddechowo i krążeniowo. Stopień sprawności według skali Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) wynosił 0. W badaniu przedmiotowym spośród odchyłań stwierdzono nieznaczną splenomegalię. Ponadto w wywiadzie u chorej stwierdzano stabilne nadciśnienie tętnicze oraz polipy jelita grubego.

W przeprowadzonej diagnostyce hematologicznej wykazano podwyższenie liczby krwinek białych (WBC, *white blood cells*) — 49,5 G/L, liczba płytek krwi (PLT, *platelets*) wynosiła 398 G/L, a stężenie hemoglobiny (Hb) — 12,9 g/dl. Wyniki badań biochemicznych, służących ocenie funkcji wątroby i nerek, pozostawały w zakresie przyjętych norm. W badaniu cytologicznym BM stwierdzono zwiększoną komórkowość z pobudzeniem układu granulocytarnego, który stanowił 88% (mieloblasty — 2,5%, promielocyty — 12%, mielocyty — 10%, metamielocyty — 8,5%, granulocyty pałeczkowate — 19%, granulocyty podzielone — 28%, granulocyty kwasochłonne — 6%, granulocyty zasadochłonne — 2%). W badaniu cytogenetycznym BM we wszystkich 20 metafazach obecny był chromosom Ph (100%) (46, XX, t(9;22)(q34;q11) [20]). W molekularnym badaniu jakościowym, przeprowadzonym metodą RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*), stwierdzono obecność transkryptu BCR-ABL1 p210. Ostatecznie, po uzyskaniu wyników badań, biorąc pod uwagę przebieg i objawy kliniczne, u chorej rozpoznano CML w fazie przewlekłej. U pacjentki przeanalizowano czynniki rokownicze, uzyskując następujące rezultaty: wskaźnik Sokala — 1,01 (pośrednie ryzyko), wskaźnik Hasforda — 917 (pośrednie ryzyko), wskaźnik EUTOS score — 16 (grupa niskiego ryzyka) [7].

W początkowym okresie leczenia u chorej stosowano cytoredukcyjnie hydroksymocznik w dawce 1000 mg/dobę. W sierpniu 2011 roku rozpoczęto leczenie IM w dawce 400 mg/dobę. Po 2 miesiącach terapii IM uzyskano całkowitą remisję hematologiczną (CHR, *complete hematologic response*), potwierdzoną prawidłową wielkością śledziony w badaniu USG jamy brzusznej i ustąpieniem zgłaszanych wcześniej objawów ogólnych. Po 6 miesiącach leczenia IM w kontrolnym badaniu cytogenetycznym stwierdzono brak chromosomu Ph (całkowita odpowiedź cytogenetyczna [CCyR, *complete cytogenetic response*]). Do 6. miesiąca terapii IM tolerancja hematologiczna i pozahematologiczna pozostawały dobre. Po tym okresie zaobserwowano narastanie wartości parametrów wątrobowych. Stwierdzono wysoką aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT, *alanine aminotransferase*) do 542 U/L, aminotransferazy asparaginianowej (AST, *aspartate aminotransferase*) do 345 U/L, transpeptydazy gammaglutamylowej (GGTP, *gamma-glutamyl transpeptidase*) do 211 U/L, a aktywność fosfatazy zasadowej (ALP, *alkaline phosphatase*) wynosiła 153 U/L. U chorej stwierdzono prawidłowe wartości bilirubiny całkowitej, wynoszące 0,56 mg/dl.

Ze względu na wysokie wartości markerów uszkodzenia komórki wątrobowej zaprzestano stosowania IM. Przeprowadzono badania w kierunku wirusowego zapalenia wątroby, w tym typu C (HCV, *hepatitis C virus*) i typu B (HBV, *hepatitis B virus*), infekcji wirusem Epstein-Barr (EBV, *Epstein-Barr virus*) oraz cytomegalowirusem (CMV, *cytomegalovirus*), których wyniki były negatywne. Wykonano również badanie USG jamy brzusznej, nie uwidaczniając patologii w obrazie wątroby ani przewodów żółciowych. Po 4 tygodniach przerwy w leczeniu IM u pacjentki obserwowano znaczne zmniejszenie wartości aminotransferaz: ALT — 75 U/L i AST — 68 U/L oraz GGTP — 100 U/L, przy nadal prawidłowym stężeniu bilirubiny całkowitej. Wznowiono leczenie IM w dawce zmniejszonej do 300 mg/dobę, wykonując regularnie, co 7 dni, kontrolne badania biochemiczne funkcji wątroby. Po 2 tygodniach stosowania IM w zmniejszonej dawce ponownie obserwowano narastanie aktywności ALT do 350 U/L i AST do 210 U/L. Ponownie wstrzymano stosowanie IM i zastosowano leczenie hepatoprotekcyjne zalecone przez konsultującego hepatologa, który rozpoznał toksyczne polekowe uszkodzenie wątroby. W leczeniu stosowano acetylocysteinę 2 razy 600 mg/dobę, sylimarynę 3 razy 70 mg/dobę oraz tokoferol (witamina E) w dawce 400 mg/dobę, a także rygorystycznie przestrzeganą

dietę wątrobową. Po 5 tygodniach uzyskano normalizację parametrów aminotransferaz.

W czerwcu 2012 roku włączono do leczenia NILO w dawce 800 mg/dobę. W momencie włączenia tego leku pacjentka była w CHR i CCyR. W ilościowym badaniu molekularnym RQ-PCR, (*real-time quantitative polymerase chain reaction*) oraz w molekularnym badaniu jakościowym (RT-PCR i *nested* RT-PCR) wykazano całkowitą remisję molekularną (CMR, *complete molecular response*), którą potwierdzono w kolejnym badaniu molekularnym po 3 miesiącach. Kontynuowano leczenie NILO z dobrą tolerancją.

Przypadek 2.

Chora w wieku 61 lat z obciążonym wywiadem onkologicznym: rak brodawczakowaty tarczycy po leczeniu operacyjnym (całkowite usunięcie tarczycy) oraz po leczeniu uzupełniającym radiojodem w marcu 2003 roku — obecnie w remisji, została przyjęta w październiku 2011 roku do Kliniki Hematologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego z podejrzeniem MPN. W wywiadzie podawała postępującą od około 4 miesięcy utratę masy ciała (> 8 kg w ciągu ostatnich 4 miesięcy), ogólne osłabienie, stany gorączkowe bez cech infekcji, a w morfologii krwi obwodowej od kilku miesięcy stwierdzano narastającą leukocytozę (WBC w granicach 12–18 G/l).

Przy przyjęciu do Kliniki chora była w dobrym stanie ogólnym, wydolna oddechowo i krążeniowo. Stopień sprawności według skali WHO wynosił 0. W badaniu przedmiotowym, poza blizną po zabiegu usunięcia tarczycy, nie stwierdzono odchyień od stanu prawidłowego. W badaniu morfologii krwi obwodowej liczba WBC wynosiła 13,7 G/L, liczba PLT — 285 G/L, a stężenie Hb — 10,6 g/dl. W badaniach biochemicznych stwierdzono podwyższoną do 480 U/L aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*) oraz podwyższone stężenie kwasu moczowego — 10,5 mg/dl. W badaniu USG jamy brzusznej wielkość śledziony oceniono na 12 cm; nie uwidoczniło powiększenia wątroby. W wykonanym badaniu cytologicznym BM stwierdzono zwiększoną komórkowość, z pobudzeniem układu granulocytarnego stanowiącego 91% (mieloblasty — 3%, promielocyty — 10%, mielocyty — 9%, metamielocyty — 10%, granulocyty pałeczkowate — 21%, granulocyty podzielone — 30%, granulocyty kwasochłonne — 6%, granulocyty zasadochłonne — 2%). W badaniu cytogenetycznym BM wykazano obecność chromosomu Ph w 90% w 22 analizowanych metafazach (46,

XX, t(9;22)(q34;p11) [20/22]). W molekularnym badaniu jakościowym metodą RT-PCR stwierdzono obecność transkryptu *BCR-ABL1* p210. U pacjentki rozpoznano CML w fazie przewlekłej. Wskaźniki rokownicze u tej chorej przedstawiały się następująco: wskaźnik Sokala — 0,72 (niskie ryzyko), wskaźnik Hasforda — 1077 (ryzyko pośrednie) i EUTOS *score* — 21 (niskie ryzyko).

W pierwszych 2 tygodniach od rozpoznania CML w leczeniu stosowano hydroksymocznik w dawce 500 mg/dobę. Następnie rozpoczęto leczenie IM w dawce 400 mg/dobę. Było ono dobrze tolerowane przez chorą. Po 2 miesiącach terapii stwierdzono CHR, a po 6 miesiącach pacjentka uzyskała CCyR. W maju 2012 roku (po 7 miesiącach leczenia) wystąpiły objawy toksyczności wątrobowej. W badaniach kontrolnych obserwowano narastanie aktywności ALT i AST oraz stężenia bilirubiny całkowitej. W momencie gdy aktywność ALT wynosiła 400 U/L, a AST — 253 U/L, przy stężeniu bilirubiny całkowitej 1,5 mg/dl, u chorej wstrzymano stosowanie IM. Po konsultacji z hepatologiem zalecono leczenie hepatoprotekcyjne (acetylocysteina, sylimarol, witamina E) i wykonano badania w kierunku infekcji wirusowej, ale nie znaleziono czynnika zakaźnego.

Po 6 tygodniach stan czynności wątroby znacznie się poprawił i wówczas wznowiono leczenie IM w dawce 300 mg/dobę. Jednak po 2 tygodniach w badaniach kontrolnych nastąpiła ponowna eskalacja aktywności ALT i AST. Po wstrzymaniu leczenia i normalizacji parametrów wątrobowych podjęto decyzję o zmianie leczenia na NILO w dawce 800 mg/dobę. Tolerancja leczenia była dobra. Po 6 miesiącach terapii NILO u chorej stwierdzono większą odpowiedź molekularną (MMR, *major molecular response*).

Dyskusja

Zastosowanie TKI, zarówno IM, jak i NILO czy DAZA, jest obecnie standardem leczenia chorych na CML. Terapia za pomocą TKI daje duże szanse na szybkie i trwale uzyskanie remisji hematologicznych, cytogenetycznych czy molekularnych. Jednak sukces terapeutyczny w niektórych przypadkach jest obarczony wystąpieniem działań niepożądanych. Wśród pozahematologicznych działań niepożądanych po zastosowaniu IM — oprócz uogólnionej retencji płynów, obrzęków, zmian skórnych — może wystąpić hepatotoksyczność. Najczęściej jest ona obserwowana jako izolowane powikłanie po IM, ale w piśmiennictwie można znaleźć opis przypadków współwystępowania hepatotoksyczno-

ści z innymi działaniami niepożądanymi, najczęściej ze zmianami skórnymi [8]. Wzrost aktywności enzymów wątrobowych jest powszechny w trakcie leczenia IM, jednak toksyczność w stopniach 3. i 4. spotyka się u mniej niż 5% pacjentów [9]. Podwyższone stężenie bilirubiny całkowitej w stopniach 3. i 4. według WHO raportowano w badaniach klinicznych u 0,4–3,5% pacjentów [10].

Najczęściej do uszkodzenia komórki wątrobowej dochodzi po 6 miesiącach od rozpoczęcia terapii IM, jednak niekiedy — nawet po kilku tygodniach leczenia — może się rozwinąć hepatotoksyczność [11]. Nie wykazano zależności między dawką IM a prawdopodobieństwem wystąpienia toksyczności wątrobowej [12]. Wydaje się, że jej wystąpienie może się wiązać z przyjmowaniem równocześnie przez chorego innych leków, które wpływają na metabolizm TKI. W ostatnio opublikowanych doniesieniach szczególną uwagę zwrócono na niekorzystny wpływ na funkcjonowanie wątroby skojarzenia IM z acetaminofenem [12].

Normalizację parametrów wątrobowych najczęściej obserwuje się po kilku tygodniach od wstrzymania terapii IM. U części pacjentów po ponownym włączeniu leku w zmniejszonej dawce nie obserwowano nawrotu hepatotoksyczności. Opublikowane wyniki badań klinicznych wskazują, że grupa mniej niż 0,5% pacjentów leczonych IM musiała całkowicie odstawić lek z powodu jego hepatotoksyczności [13].

Patomechanizm uszkodzenia hepatocytów przez IM nie jest do końca poznany. W badaniach histopatologicznych bioptatów wątroby od chorych leczonych IM stwierdzano ogniskową martwicę z towarzyszącym naciekiem limfocytarnym, jak również zmiany o charakterze zapalnym z obecnością odczynu z plazmacytów i granulocytów [9, 12].

Postępowanie w przypadku wystąpienia objawów hepatotoksyczności po IM nie jest jasno określone. Z informacji zawartych w charakterystyce produktu leczniczego (*Glivec*[®], Novartis) wynika, że jeśli stężenie bilirubiny całkowitej przekroczy 3-krotność górnej granicy normy i/lub aktywność aminotransferaz wątrobowych przekroczy 5-krotność górnej granicy normy, to należy wstrzymać leczenie IM do czasu regresji tych parametrów, a następnie można kontynuować podawanie tego leku w zmniejszonej dawce. Jednak, biorąc pod uwagę wcześniej wspomniany obraz histopatologiczny bioptatów wątroby, można przyjąć, że co najmniej w niektórych przypadkach hepatotoksyczność indukowana IM może mieć charakter immunologiczny i przebiegać w mechanizmie idiosynkrazji. Dlatego wydaje się za zasadne stosowanie w tej

grupie pacjentów kortykosteroidów w celu wyhamowania reakcji autoimmunologicznej [9].

W każdym przypadku w diagnostyce różnicowej należy brać pod uwagę możliwość infekcji wirusowej. W tym celu trzeba wykonać badania serologiczne i/lub molekularne, by wykluczyć zakażenie wirusowe, w tym w kierunku HCV, HBV, EBV i CMV.

Chorzy na CML, u których z powodu hepatotoksyczności nie można kontynuować leczenia IM, mogą kontynuować terapię jednym z inhibitorów drugiej generacji, w tym NILO lub DAZA. W pracy przedstawiono 2 przypadki kliniczne, w których w związku z toksycznością wątrobową po IM istniały wskazania do zmiany leku. W obu przypadkach zastosowano NILO, który okazał się lekiem dobrze tolerowanym. Nie obserwowano klinicznych ani laboratoryjnych wykładników nawrotu hepatotoksyczności w trakcie terapii NILO, co potwierdza dane z piśmiennictwa wskazujące, że tylko sporadycznie może wystąpić krzyżowa nietolerancja leku. Dodatkowo zastosowanie NILO u tych chorych przyczyniło się do uzyskania szybkich i głębokich odpowiedzi molekularnych, co jest oczekiwanym celem leczenia pacjentów z CML.

Piśmiennictwo

1. Quintas-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009; 113: 1619–1630.
2. Hehlmann R., Hochhaus A., Baccarani M. European Leukemia-Net. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007; 370: 342–350.
3. Peng B., Lloyd P., Schran H. Clinical pharmacokinetics of imatinib. *Clin. Pharm.* 2005; 44: 879–894.
4. Mindikoglu A.L., Regve A., Bejarano P.A. i wsp. Imatinib mesylate (Gleevec) hepatotoxicity. *Dig. Dis. Sci.* 2007; 52: 598–601.
5. Druker B.J., Talpaz M., Resta D.J. i wsp. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004; 344: 1031–1037.
6. Cohen M.H., Williams G., Johnson J.R. i wsp. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 935–942.
7. Hasford J., Baccarani M., Hoffmann V. i wsp. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood* 2011; 118: 686–692.
8. Kong J.H., Yoo S.H., Lee K.E. i wsp. Early imatinib mesylate-induced hepatotoxicity in chronic myelogenous leukaemia. *Acta Haematol.* 2007; 118: 205–208.
9. Ferrero D., Pogliani E.M., Rege-Cambrin G. i wsp. Corticosteroids can reverse severe imatinib-induced hepatotoxicity. *Haematologica* 2006; 91: 78–80.
10. Ridruejo E., Cacchione R., Villamil A.G. i wsp. Imatinib-induced fatal acute liver failure. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13: 6608–6611.
11. Cross T.J.S., Bagot C., Portmann B., Wendon J., Gillett D. Imatinib mesylate as a cause of acute liver failure. *Am. J. Hematol.* 2006; 81: 189–192.
12. Lewandowska M., Gniot M., Lewandowski K. Całkowita remisja molekularna po podaniu nilotinibu u chorej na przewlekłą białaczkę szpikową w fazie przewlekłej z objawami nietolerancji imatinibu po zażyciu acetaminofenu. *Hematologia* 2011; 2: 23–27.
13. Kolkowska-Leśniak A., Budziszewska K., Seferyńska I., Warzocha K. Toksyczne uszkodzenie wątroby w przebiegu leczenia imatynibem chorych z przewlekłą białaczką szpikową. *Hematologia* 2010; 1: 254–260.