

بررسی ارتباط سطوح ویتامین‌ها با سابقه مول هیداتیفرم در

زنان: مطالعه مروری سیستماتیک

مژده بنائی^۱، دکتر سیده هانیه علم‌الهدی^{۲*}، مریم بهشتی نسب^۳، لیلا محمدخانی شهری^۴، فاطمه بیات^۵

۱. دانشجوی دکتری بهداشت باروری، مرکز تحقیقات مادر و کودک، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۲. استادیار گروه مامایی، مرکز تحقیقات مامایی و بهداشت باروری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. مربی گروه مامایی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز، اهواز، ایران.
۴. دانشجوی دکتری بهداشت باروری، دانشکده پرستاری و مامایی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
۵. دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت باروری، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۶

خلاصه

مقدمه: مول هیداتیفرم، یکی از مخاطرات اورژانسی در بارداری است که می‌تواند زندگی زنان را در سنین باروری با خطر مرگ مواجه نماید. در مطالعات مختلف عوامل خطر متفاوتی در رابطه با بروز این بیماری ذکر شده است. یکی از این عوامل خطر، کمبودهای تغذیه‌ای به‌ویژه کمبودهای ویتامینی است که می‌تواند منجر به بروز این عارضه گردند. بنابراین مطالعه حاضر با هدف مرور سیستماتیک ارتباط بین سطح خونی ویتامین‌ها در زنان با بروز مول هیداتیفرم انجام گرفت.

روش کار: در این مطالعه مرور سیستماتیک جهت یافتن مقالات مرتبط پایگاه اطلاعاتی بین‌المللی Web of Science، Scopus، PubMed، Embase، Google Scholar و پایگاه اطلاعاتی ملی همچون MagIran، SID، IranDoc و IranMedex با استفاده از کلمات کلیدی شامل: Gestational Hydatidiform Mole، Molar Pregnancy، Trophoblastic Disease و Vitamin Molar Pregnancy با عملگرهای بولین OR و AND بدون محدودیت زمانی مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت دو پژوهشگر به‌طور مستقل مقالات را جهت ارزیابی کیفیت (با استفاده از چک‌لیست NOS) و استخراج یافته‌های اصلی آنها مورد بررسی قرار دادند.

یافته‌ها: در نهایت ۱۰ مقاله نهایی با حجم نمونه کلی ۱۱۳۴ نفر مورد ارزیابی قرار گرفت. سال انتشار مقالات از ۱۹۸۸ تا ۲۰۱۸ و تمامی مطالعات وارد شده از نوع مورد شاهدهی بودند. یافته‌ها نشان داد که سطوح ویتامین‌های A، D، E، C، B9 و B12 با مول هیداتیفرم ارتباط دارند؛ به‌طوری‌که کاهش سطوح این ویتامین‌ها، منجر به بروز بارداری مولار می‌شود. در اکثر مطالعات وارد شده، کاهش سطوح این ویتامین‌ها هم در بارداری مولار کامل و هم ناکامل وجود داشت.

نتیجه‌گیری: کاهش سطوح ویتامین‌های A، D، E، C، B9 و B12 می‌تواند احتمال ابتلاء به حاملگی مولار را افزایش دهند. بنابراین با بررسی و تعیین کمبودهای تغذیه‌ای در افراد با سابقه بارداری مولار، می‌توان با طراحی کارآزمایی‌های بالینی، تأثیر و تجویز مکمل‌های ویتامینی بر بروز مجدد را بررسی کرد.

کلمات کلیدی: بیماری تروفوبلاستیک بارداری، مول هیداتیفرم، ویتامین

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر سیده هانیه علم‌الهدی؛ مرکز تحقیقات مامایی و بهداشت باروری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱-۸۸۲۰۲۵۱۲؛ پست الکترونیک: alamolhoda.h@gmail.com

مقدمه

مول هیداتیفرم با تورم پرزهای جفتی، افزایش بی‌رویه سلول‌های تروفوبلاست پرزدار و عدم رشد یا تکامل غیرطبیعی جنین شناخته می‌شود (۱). شیوع مول هیداتیفرم در سرتاسر جهان بسیار متغیر بوده و در آسیا، خاورمیانه و آفریقا دارای بیشترین شیوع می‌باشد (۲). شیوع بارداری مولار در مطالعاتی که در آمریکای شمالی، اروپا، استرالیا و نیوزلند انجام شد، بین ۰/۵۷ تا ۱/۱ در ۱۰۰۰ بارداری بود، در حالی که در آسیای جنوبی و ژاپن میزان شیوع بالاتر و در حد ۲ مورد در هر ۱۰۰۰ بارداری گزارش شد (۳). در ایران نیز آمار متفاوتی از نقاط مختلف گزارش شده است. شیوع بارداری مولار در سندنجد در طی ۱۰ سال ۲/۰۲ مورد در هر ۱۰۰۰ زایمان گزارش شده است (۴)، در حالی که در همدان ۳/۱ مورد به ازای ۱۰۰۰ تولد زنده (۵) و در تهران ۷ مورد به ازای ۱۰۰۰ تولد زنده گزارش شده است (۶).

از مهم‌ترین دلایل اهمیت بارداری مولار، احتمال تبدیل آن به نئوپلازی جفتی بارداری (GTN¹) است. در حقیقت علت اکثر موارد نئوپلازی‌های جفتی، مول هیداتیفرم می‌باشد (۷). مول هیداتیفرم یکی از مخاطرات اورژانسی در بارداری است که می‌تواند زندگی زنان را در سنین باروری با خطر مرگ مواجه نماید (۸). بارداری مولار همچنین می‌تواند خونریزی‌های رحمی را افزایش دهد، سبب کم‌خونی مادر شود، استفراغ‌های شدید و مقاوم ایجاد کرده و در نهایت منجر به پره‌اکلامپسی، هیپرتیرئوئیدی و اختلال عملکرد ریه گردد (۹). علاوه بر آن، عوارض بارداری مولار صرفاً جسمی نبوده و می‌تواند پیامدهای روانی نیز به همراه داشته باشد (۱۰). سلامت زنان در کشورهای در حال توسعه عمیقاً تحت تأثیر عوارض مول هیداتیفرم خصوصاً انواع مهاجم آن قرار دارد (۱۱).

علل مختلفی به عنوان عوامل خطر بروز مول شناخته شده‌اند. یکی از این عوامل خطر، سن مادر است. کاهش و افزایش سن مادر هر دو می‌تواند احتمال خطر ابتلاء به این عارضه را افزایش دهد (۱۲). از دیگر عوامل خطر بروز مول هیداتیفرم می‌توان به سابقه قبلی حاملگی

مولار اشاره کرد (۱۳). مطالعات اخیر نشان داده‌اند در زنانی که سابقه ابتلاء به مول هیداتیفرم دارند، خطر بروز مجدد بارداری مولار در بارداری‌های بعدی افزایش می‌یابد (۱۴، ۱۵). خطر ابتلای مجدد به بارداری مولار پس از یک بار ابتلاء به آن، ۲-۱٪ افزایش داشته و در صورتی که فرد ۲ بار به‌صورت پیاپی مبتلا به بارداری مولار گردد، احتمال ابتلای بعدی ۲۳٪ افزایش دارد (۱۶). عوامل ژنتیکی، سقط‌های مکرر، نژاد، سابقه استفاده یا جاگذاری IUD² و مصرف قرص خوراکی پیشگیری از بارداری، گروه خونی، وضعیت اقتصادی-اجتماعی و ناباروری، از دیگر عوامل خطر در ایجاد بارداری مولار می‌باشند (۲۱-۱۷).

یکی دیگر از عوامل خطر بروز بارداری مولار، کمبودهای ویتامینی است که منجر به تغییرات پاتولوژیک می‌شود. برخی مطالعات نشان داده‌اند که کمبودهای تغذیه‌ای مانند کاهش مصرف چربی حیوانی و کاروتن رژیم غذایی که پیش‌سازی برای ساخت ویتامین A هستند نیز می‌توانند احتمال ابتلاء به بارداری مولار را افزایش دهند (۲۴-۲۲). در مطالعه اندریجونو و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شد که سطح پایین رتینول در کبد و خون زنان مبتلا به مول هیداتیفرم باعث کاهش اسید رتینوئیک در سلول شده و منجر به تکثیر کنترل نشده سلول‌های تروفوبلاستیک و کاهش آپوپتوز و در نتیجه افزایش خطر تبدیل مول هیداتیفرم می‌شود (۲۵).

واضح است که مدیریت بارداری مولار از جمله پیشگیری، تشخیص زودرس و پیگیری آن برای نجات جان مادر، از اهمیت بسیاری برخوردار است. با توجه به عوارض بارداری مولار و اهمیت پیشگیری از بروز مجدد آن و همچنین نبود مطالعه‌ای سیستماتیک در زمینه نقش ویتامین‌ها در پیشگیری از بروز آن، مطالعه حاضر با هدف بررسی سیستماتیک ارتباط سطوح ویتامین‌ها با سابقه مول هیداتیفرم در زنان انجام شد.

روش کار

در این مطالعه مرور سیستماتیک جامعه پژوهش شامل تمام مطالعات مشاهده‌ای به‌صورت مورد شاهدهی در

² Intrauterine device

¹ Gestational Trophoblastic Neoplasia

مراحل قبلی خوانده شد. در نهایت از میان مقالات انتخاب شده باقی‌مانده، ۱۰ مقاله که شرایط ورود به مطالعه را داشتند، انتخاب و کیفیت مقالات توسط دو نویسنده به‌طور جداگانه با استفاده از ابزار ارزیابی کیفیت مربوطه (ابزار استاندارد NOS) بررسی شد. برای سازماندهی مطالعات، از نرم‌افزار مدیریت منابع اطلاعاتی Endnote استفاده شد.

معیارهای ورود به مطالعه شامل مقالات منتشر شده تحلیلی به‌صورت مورد-شاهدی، به زبان انگلیسی و فارسی که واحد پژوهش آنها زنان با سابقه بارداری مولار بودند و سطح ویتامین‌های این افراد سنجیده می‌شد. مقالات مروری و نامه به سردبیر، به‌علت عدم استفاده از داده‌های اولیه انتخاب نشدند. با مطالعه دقیق عنوان و چکیده مقالات واجد معیارهای ورود توسط محقق، تعداد زیادی از آنها به‌علت غیرمرتبط بودن با هدف مطالعه کنار گذاشته شدند. در صورتی که پس از مطالعه عنوان و چکیده، امکان تصمیم‌گیری در مورد مقاله وجود نداشت، به متن کامل آن رجوع شد. جهت اطمینان از بازیابی تمام مدارک، فهرست منابع مقالات نیز مورد جستجو قرار گرفت. پس از تکمیل جستجوی مقالات، با استفاده از فلوجارت، ۱۰ مقاله نهایی انتخاب شدند (نمودار ۱).

برای ارزیابی کیفی مقالات مشاهده‌ای از چک‌لیست تعدیل شده اووتاوا^۱ استفاده شد. این ابزار توسط ولز و همکاران (۲۰۰۰) جهت سنجش کیفیت مطالعات غیرتجربی طراحی شده است و برای ارزیابی کیفیت مطالعات مشاهده‌ای استفاده می‌شود که هر مطالعه را از نظر کیفیت طراحی مطالعه، روش جمع‌آوری داده‌ها، فرآیند ثبت‌نام نمونه‌ها، میزان پاسخ‌دهی، قابلیت تعمیم نتایج و تحلیل‌های آماری مورد بررسی قرار می‌دهد و دارای ۴ بخش (Detection bias، Performance bias، Selection bias و Information bias) می‌باشد. جهت نمره‌دهی به هر آیتم باکیفیت، ستاره تعلق می‌گیرد و حداکثر نمره ۹ می‌باشد (۲۶). جدول ۲، نمره حاصل از کیفیت‌سنجی مطالعات را نشان می‌دهد.

در نهایت برای استخراج داده‌ها از متن این مقالات، دو پژوهشگر با استفاده فرم محقق‌ساخته اطلاعاتی همچون

زمینه وضعیت ویتامین‌ها در زنان با سابقه حاملگی مولار بود. جستجو توسط محققان در پایگاه‌های اطلاعاتی بین‌المللی Scopus، Web of Science، PubMed، Embase و Google Scholar و پایگاه داده‌های ملی همچون بانک اطلاعات نشریات کشور (MagIran)، پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID)، پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران (IranDoc) و سامانه دانش گستر برکت (IranMedex) انجام شد و تنها مقالات فارسی و انگلیسی بررسی شد. تمام مقالات تا زمان جستجو توسط دو پژوهشگر مستقل، مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر آن مقالات ارائه شده در سمینارها و کنگره‌های ملی، گزارش‌های ملی و پایان‌نامه‌های مرتبط با وضعیت ویتامین‌ها در زنان با سابقه حاملگی مولار نیز بررسی و در صورت وجود چکیده مقالات برای دسترسی به فایل کامل مقاله با نویسنده مسئول مکاتبه شد.

برای یافتن مقالات مرتبط در پایگاه‌های اطلاعاتی، کلیدواژه‌ها بر اساس مش انتخاب شده و شامل: Gestational Hydatidiform Mole، Molar Trophoblastic Disease، Pregnancy Gestational Trophoblastic Neoplasia و Vitamin بودند که با عملگرهای بولین OR و AND ترکیب شدند. جهت حفظ تمامی داده‌های بارزش، محدودیتی از نظر بُعد زمانی در نظر گرفته نشد و تمامی مقالات مرتبط منتشر شده تا تاریخ ۲۵ نوامبر ۲۰۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور دستیابی به حداکثر میزان جامعیت جستجو، به شکل دستی تمامی مقالات نهایی مرتبط با موضوع مورد بررسی قرار گرفتند تا سایر منابع احتمالی نیز یافت شوند.

ترتیب مراحل انجام این فرآیند بدین‌صورت بود که ابتدا از طریق جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی مربوطه و سایر منابع، ۱۶۱۴ مقاله استخراج و وارد نرم‌افزار Endnote شد و سپس ۵۵۹ مقاله تکراری با استفاده از نرم‌افزار Endnote حذف و عنوان و چکیده ۱۰۵۵ مقاله بررسی شد. ۱۰۱۳ مقاله به‌علت غیرمرتبط بودن با هدف پژوهش حذف و سپس متن کامل مقالات باقی‌مانده از

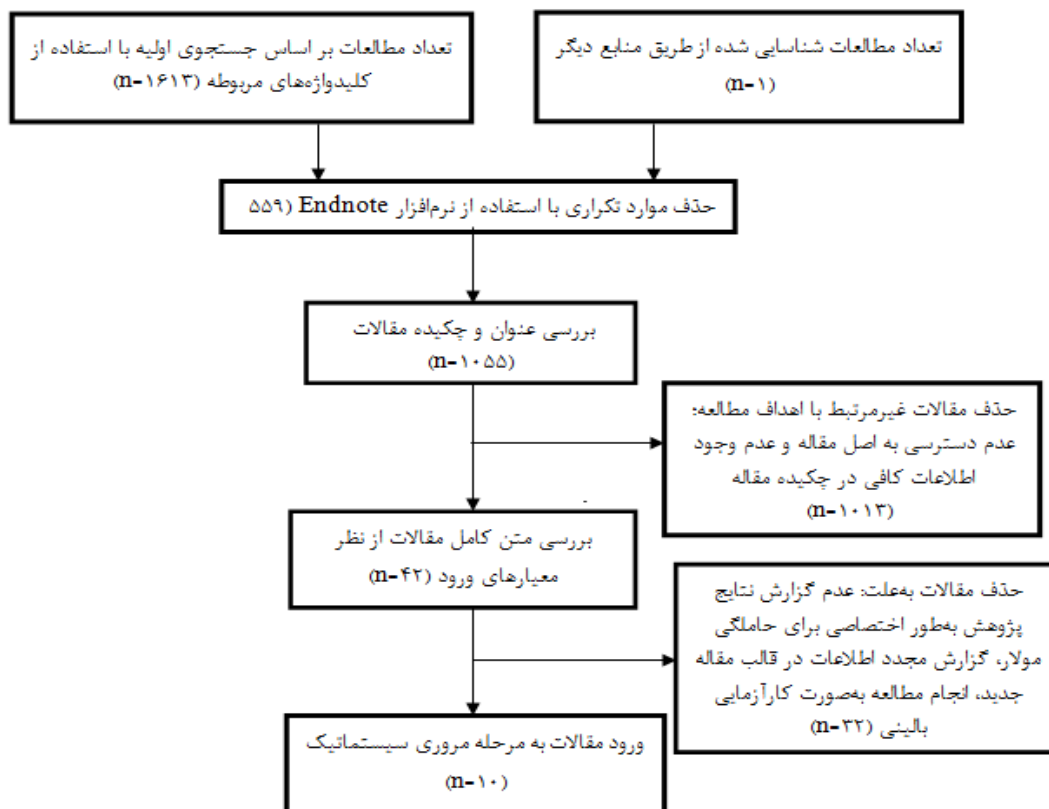
¹Newcastle-Ottawa Scale

خصوصیات کلی مقالات (همچون نویسنده اول، سال چاپ)، محل انجام پژوهش، تعداد نمونه و گروه هدف، مشخصات مشارکت‌کنندگان (دموگرافیک، سن و سایر)، سطح ویتامین‌های اندازه‌گیری شده این افراد و نتیجه‌گیری نویسندگان را به‌صورت مستقل استخراج نمودند.

یافته‌ها

در این مطالعه، تمام مقالات منتشر شده بر اساس هدف پژوهش در پایگاه داده‌های الکترونیکی مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله اول از طریق جستجوی اولیه با کلیدواژه‌های مربوطه، ۱۶۱۴ مقاله (PubMed=۲۱۸؛ Scopus=۶۳۶؛ Web of Science=۶۰؛ Embase=۶۸۳؛ SID=۴؛ MagIran=۳)؛

IranDoc=۵؛ IranMedex=۴ و یک مقاله از طریق جستجوی دستی در موتور جستجوگر Google Scholar استخراج شد. پس از حذف مقالات تکراری با مرور عنوان و بررسی مقالات باقی‌مانده از طریق چکیده و سپس متن کامل مقاله، در نهایت ۱۰ مقاله نهایی با حجم نمونه کلی ۱۱۳۴ نفر مورد ارزیابی قرار گرفت (نمودار ۱). سال انتشار مقالات از ۱۹۸۸ تا ۲۰۱۸ و تمامی مطالعات وارد شده از نوع مورد شاهدهی بودند. ۶ مطالعه به بررسی ارتباط ویتامین A و مشتقات آن، ۲ مطالعه به بررسی ویتامین D، ۳ مطالعه به بررسی آنتی‌اکسیدان‌ها (ویتامین E و ویتامین C) و ۲ مطالعه دیگر به بررسی ارتباط ویتامین فولات (B9) و B12 با مول هیداتیفرم پرداخته بودند (جدول ۱).



نمودار ۱- فلوچارت مراحل ورود مطالعات به مرور سیستماتیک

جدول ۱- مشخصات مقالات مشاهده‌ای مورد بررسی در زمینه ارتباط ویتامین‌ها با مول هیدراتیفرم

نویسنده / سال انتشار	محل مطالعه	گروه‌های مورد مطالعه	روش جمع‌آوری اطلاعات	نتیجه‌گیری	نمره ارزیابی کیفیت
برکوویتز و همکاران (۱۹۹۵) (۲۷)	انگلیس	۶۵ زن با حاملگی مولار ناکامل شناخته شده و ۱۳۰ زن سالم با تولد زنده در گروه کنترل	پرسشنامه تغذیه محقق ساخته بر اساس فراوانی مصرف مواد غذایی	عوامل تغذیه‌ای همچون کمبود پروتئین، چربی و ویتامین A یا کاروتن با خطر بروز حاملگی مولار ناکامل همراه نیست.	۵
برکوویتز و همکاران (۱۹۸۵) (۲۹)	انگلیس	۹۰ زن با حاملگی مولار کامل شناخته شده و ۹۰ زن سالم با تولد زنده در گروه کنترل	پرسشنامه تغذیه محقق ساخته بر اساس فراوانی مصرف مواد غذایی	زنان مبتلا به مول کامل به‌طور معناداری بیشتر دچار کمبود مواد غذایی دارای کاروتن (پیش‌ساز ویتامین A) بودند ($p=0.02$). زنانی که مصرف مواد غذایی حاوی کاروتن در آنها بالاتر بود، به میزان ۴۰٪ کمتر دچار بارداری مولار می‌شدند. با افزایش مصرف کاروتن، روند کاهش قابل توجهی در بارداری مولار کامل وجود داشت.	۷
هارما و همکاران (۲۰۰۳) (۳۲)	ترکیه	۳۸ زن با حاملگی مولار کامل و ۳۱ زن با بارداری سالم	سنجش سطوح وضعیت آنتی‌اکسیدان پلاسما، سطح آنتی‌اکسیدان کامل و شاخص استرس اکسیداتیو	میزان TAOP در زنان مبتلا به بارداری مولار به‌طور معنی‌داری پایین‌تر و میزان شاخص استرس اکسیداتیو در زنان با بارداری مولار به‌طور معناداری بیشتر بود ($p<0.001$). مکمل‌های آنتی‌اکسیدان همچون ویتامین E و C جهت درمان توصیه می‌شود.	۵
هارما و همکاران (۲۰۰۴) (۳۳)	ترکیه	۳۷ زن با حاملگی مولار کامل و ۵۲ زن با بارداری سالم در تریمستر اول	سنجش سطوح فولات (ویتامین B9)، B12 و هموسیستئین	در زنان مبتلا به بارداری مولار کامل میزان ویتامین B12 به‌طور معناداری بالاتر و میزان فولات به‌طور معناداری پایین‌تر بود ($p=0.012$ و $p=0.008$). میزان هموسیستئین در زنان بارداری مولار بالاتر بود که این ارتباط معنادار نبود. فولات نقشی حفاظتی در پیشگیری از بارداری مولار دارد.	۶
کوکالی و همکاران (۲۰۰۸) (۳۴)	ترکیه	۶۸ زن با حاملگی مولار کامل و ۱۰۰ زن با بارداری سالم در سه ماهه اول بارداری	سنجش سطوح فولات (ویتامین B9)، B12 و هموسیستئین	میزان هموسیستئین در زنان بارداری مولار به‌طور معناداری بالاتر و میزان فولات به‌طور معنادار پایین‌تر بود ($p<0.001$). میزان ویتامین B12 میان دو گروه مشابه بود. میزان هموسیستئین، ویتامین B12 و فولات میان دو نوع بارداری مولار کامل و ناکامل متفاوت نبود.	۷
کلوسری و همکاران (۲۰۰۹) (۳۱)	ترکیه	۲۴ زن با حاملگی مولار کامل و ۲۴ زن با بارداری سالم در سه ماهه اول و ۲۴ زن غیرباردار سالم	سنجش سطوح تعدادی از مواد معدنی، کاتالاز، ویتامین A، D و E	میزان کاتالاز، Co، Cu، ویتامین A، D و E در زنان مبتلا به بارداری مولار به‌طور معناداری پایین‌تر از دو گروه دیگر بود ($p<0.001$). میزان Fe، Cu و Cd در زنان مبتلا به بارداری مولار به‌طور معناداری بالاتر بود ($p<0.001$).	۷
پارازینی و همکاران (۱۹۸۸) (۲۲)	ایتالیا	۱۴۸ زن با سابقه بیماری تروفوبلاستیک بارداری و دو گروه کنترل	پرسشنامه تغذیه محقق ساخته بر اساس فراوانی مصرف مواد غذایی	فراوانی مصرف مواد غذایی حاوی ویتامین A و پروتئین حیوانی در زنان با سابقه بیماری تروفوبلاستیک بارداری کمتر بود.	۸
حسن‌زاده و همکاران (۲۰۱۶) (۳۵)	ایران	۳۰ زن مبتلا به تومور جفتی و ۴۸ زن با بارداری طبیعی	سنجش سطح سرمی ۲۵ هیدروکسی ویتامین D	سطح سرمی ویتامین D در زنان مبتلا به تومور جفتی بارداری به‌طور معناداری کمتر از زنان باردار طبیعی بود ($p<0.001$).	۶
ال خفاجی و همکاران (۲۰۱۸) (۲۸)	عراق	۲۵ زن با حاملگی مولار و ۲۵ زن با بارداری سالم در سه ماهه اول و ۲۵ زن غیرباردار سالم	سنجش میزان هموسیستئین، پروتئین متصل شونده به رتینول، پره آلبومین و آلبومین	سطح سرمی پره‌آلبومین در زنان مبتلا به بارداری مولار به‌طور معناداری کمتر از دو گروه دیگر بود ($p<0.001$). میزان هموسیستئین، آلبومین و پروتئین متصل شونده به رتینول میان سه گروه تفاوت معناداری نداشت.	۷
اندريچونو و همکاران (۱۹۹۷) (۳۰)	اندونزی	۳۰ زن با حاملگی مولار و ۳۰ زن با بارداری سالم	سنجش میزان رتینول خون	سطح رتینول خون در زنان مبتلا به حاملگی مولار ۱۰/۵۲ و در زنان با بارداری سالم ۱۲/۸۹ میکروگرم در دسی‌لیتر بود که تفاوت معناداری بین دو گروه وجود داشت.	۵

ویتامین A و مشتقات آن

سطوح ویتامین A و پیش‌ساز آن در ۵ مطالعه به‌طور مستقل و در یک مطالعه به همراه ویتامین‌های دیگر در ارتباط با مول هیداتیفرم سنجیده شده بود. مطالعه برکوویتز و همکاران (۱۹۹۵) نشان داد که عوامل تغذیه-ای همچون کمبود پروتئین، چربی و ویتامین A یا کاروتن با خطر بروز حاملگی مولار ناکامل همراه نیست (۲۷). ال خفاجی و همکاران (۲۰۱۸) میزان پروتئین متصل‌شونده به رتینول را در سه گروه حاملگی مولار، بارداری سالم در سه ماهه اول بارداری و زنان غیرباردار سالم سنجیدند و به این نتیجه رسیدند که میزان پروتئین متصل‌شونده به رتینول میان سه گروه تفاوت معناداری ندارد (۲۸)، اما در مطالعه برکوویتز و همکاران (۱۹۸۵)، زنان مبتلا به مول کامل به‌طور معناداری بیشتر دچار کمبود مواد غذایی دارای کاروتن (پیش‌ساز ویتامین A) بودند ($p=0/02$). زنانی که به میزان بیشتری مواد غذایی حاوی کاروتن مصرف می‌کردند، به میزان ۴۰٪ کمتر دچار بارداری مولار می‌شدند. با افزایش مصرف کاروتن، کاهش قابل توجهی در بروز بارداری مولار کامل مشاهده می‌شد (۲۹). پارازینی و همکاران (۱۹۸۸) با مطالعه بر روی ۱۴۸ زن با سابقه بیماری تروفوبلاستیک بارداری به همراه دو گروه کنترل نشان دادند که فراوانی مصرف مواد غذایی حاوی ویتامین A و پروتئین حیوانی در زنان با سابقه بیماری تروفوبلاستیک بارداری کمتر بود (۲۲).

در مطالعه اندریجونو و همکاران (۱۹۹۷) سطح رتینول خون در زنان مبتلا به حاملگی مولار ۱۰/۵۲ و در زنان با بارداری سالم ۱۲/۸۹ میکروگرم در دسی‌لیتر بود که تفاوت معناداری بین دو گروه وجود داشت (۳۰). در مطالعه کلوسری و همکاران (۲۰۰۹)، میزان ویتامین A در بارداری مولار به‌طور معناداری پایین‌تر از زنان با دار و غیرباردار سالم بود ($p<0/001$) (۳۱).

ویتامین D

در مطالعه حسن‌زاده و همکاران (۲۰۱۶) که سطح سرمی ۲۵ هیدروکسی ویتامین D را در ۳۰ زن مبتلا به تومور جفتی جفت (GTN) و ۴۸ زن با بارداری طبیعی اندازه‌گیری نمودند، سطح سرمی ویتامین D در زنان

مبتلا به تومور جفتی بارداری به‌طور معناداری کمتر از زنان باردار طبیعی بود ($p<0/001$) (۳۵). در مطالعه کلوسری و همکاران (۲۰۰۹)، میزان ویتامین D در بارداری مولار به‌طور معناداری پایین‌تر از زنان با دار و غیرباردار سالم بود ($p<0/001$) (۳۱).

ویتامین B9 و B12

در مطالعه هارما و همکاران (۲۰۰۴) که سطح سرمی ویتامین B12 و فولات را در ۳۷ زن با حاملگی مولار کامل و ۵۲ زن با بارداری سالم در سه ماهه اول بارداری سنجیدند، در زنان مبتلا به بارداری مولار کامل میزان ویتامین B12 به‌طور معناداری بالاتر و میزان فولات به‌طور معناداری پایین‌تر بود ($p=0/008$, $p=0/012$). در نتیجه به این نتیجه رسیدند که فولات نقشی حفاظتی در پیشگیری از بارداری مولار دارد (۳۳)، اما در مطالعه کوکائالی و همکاران (۲۰۰۸) میزان فولات به‌طور معناداری در زنان مبتلا به بارداری مولار پایین‌تر ($p<0/001$) و میزان ویتامین B12 میان زنان مبتلا به بارداری مولار و زنان با بارداری سالم مشابه بود. همچنین میزان ویتامین B12 و فولات میان دو نوع بارداری مولار کامل و ناکامل متفاوت نبود (۳۴).

آنتی‌اکسیدان‌ها (ویتامین E و C)

در مطالعه هارما و همکاران (۲۰۰۳) که سطح آنتی‌اکسیدان پلاسما، سطح آنتی‌اکسیدان کامل (TAOP) و شاخص استرس اکسیداتیو در ۳۸ زن با حاملگی مولار کامل و ۳۱ زن با بارداری سالم سنجیده شد، میزان TAOP در زنان مبتلا به بارداری مولار به‌طور معنی‌داری پایین‌تر و میزان شاخص استرس اکسیداتیو در زنان با بارداری مولار به‌طور معناداری بیشتر بود ($p<0/001$). در نهایت گزارش نمودند که مکمل‌های آنتی‌اکسیدان همچون ویتامین E و C جهت درمان و پیشگیری از بروز مجدد بارداری مولار توصیه می‌شود (۳۲). در مطالعه کلوسری و همکاران (۲۰۰۹)، میزان ویتامین E در بارداری مولار به‌طور معناداری پایین‌تر از زنان با دار و غیرباردار سالم بود ($p<0/001$) (۳۱).

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی ارتباط سطوح ویتامین‌ها با سابقه مول هیداتیدفرم انجام شد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که سطوح ویتامین‌های A، D، E، C، B9 و B12 در زنان با حاملگی مولار کاهش یافته بود و افزایش سطوح این ویتامین‌ها از بروز مجدد بارداری مولار پیشگیری خواهد نمود.

ویتامین A و مشتقات آن

در مطالعات مختلف بررسی شده میزان ویتامین A و مشتقات آن همچون رتینول در زنان مبتلا به بارداری مولار کامل نسبت به زنان با بارداری سالم و زنان غیرباردار سالم کمتر بود (۲۲، ۳۱-۲۹). در مقابل مطالعه برکوویتر و همکاران (۱۹۹۵) نشان داد که کمبود ویتامین A با خطر بروز بارداری مولار ناکامل همراه نیست (۲۷) و در مطالعه ال خفاجی و همکاران (۲۰۱۸) نیز میزان پروتئین متصل‌شونده به رتینول میان سه گروه حاملگی مولار، بارداری سالم در سه ماهه اول و زنان غیرباردار سالم تفاوت معناداری نداشت (۲۸). در بدن ویتامین A یا پیش‌ساز ویتامین A به رتینول متابولیزه شده و در مرحله بعدی، رتینول در درون سلول‌ها به رتینوئیک متابولیزه می‌شود. رتینوئیک به گیرنده رتینوئیک متصل می‌شود؛ کمپلکس رتینوئیک و گیرنده رتینوئیک منجر به آپوپتوز شده و چرخه سلولی را خاتمه می‌بخشد (۳۶). ویتامین A نقش مهمی در پیشرفت میوز دارد. کمبود آن مسئول ایجاد تخمک نابالغ می‌باشد و از انجام صحیح میوز II جلوگیری می‌کند (۳۳).

افزایش آپوپتوز می‌تواند خطر بروز بیماری تروفوبلاستیک بدخیم^۱ (MTD) را کاهش دهد؛ به طوری که فعال شدن و القای آپوپتوز و خاتمه چرخه سلولی با اسید رتینوئیک ممکن است به‌عنوان روش درمانی برای پیشگیری از MTD اثربخش باشد (۲۵). مطالعه اندریجونو و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که سطح پایین رتینول در کبد و خون بیماران مبتلا به مول هیداتیدفرم باعث کاهش اسید رتینوئیک در سلول شده و منجر به تکثیر کنترل نشده سلول‌های تروفوبلاستیک و کاهش آپوپتوز و در نتیجه افزایش خطر تبدیل هیداتیدفرم می‌شود (۲۵).

از طرفی دیگر، در انسان ژن P53 در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ (17p13.1) قرار دارد. بسیاری از سلول‌های سرطانی ژن P53 را غیرفعال می‌کنند و به سلول‌ها اجازه می‌دهند تا از مرگ برنامه‌ریزی شده خودداری کنند و تکثیر خود را تا زمان تبدیل شدن به یک تومور ادامه دهند و ویتامین A با افزایش فعالیت P53 سبب پیشبرد آپوپتوز می‌گردد و در نتیجه می‌تواند مکانیسمی محافظ برای بدخیمی باشد (۳۷).

ویتامین D

در این بررسی سیستماتیک سطوح سرمی ویتامین D در زنان مبتلا به بارداری مولار و بیماری‌های تروفوبلاستیک بدخیم به‌طور معناداری پایین‌تر بود (۳۱، ۳۵). ویتامین D دارای اثرات ضدسرطانی است و نقش تنظیمی در سیستم ایمنی ذاتی و بر روی سلول‌های کشنده طبیعی، سلول‌های T سایتوتوکسیک و ماکروفاژها دارد (۳۸). مطالعه آیولا و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که رده سلولی JEG-3 که سلول‌های کوریوکارسینوم انسانی می‌باشند، نسبت به سلول‌های طبیعی سین سیشیوتروفوبلاست انسانی، به میزان کمتری ویتامین D (کلستریول) تولید می‌کنند. در این مطالعه بیان شد که mRNA ژن CYP27B1 در هر دو رده سلولی مشاهده شده، ولی پروتئین مربوط به آن تنها در سلول‌های طبیعی سن سیشیوتروفوبلاست مشخص گردید و در واقع کاهش تولید ویتامین D به‌علت همین مشکل در تنظیم ژن CYP27B1 می‌باشد (۳۹).

از دیگر اثرات ویتامین D بر روی سلول‌ها، همچون ویتامین A، القای تمایز و آپوپتوز سلولی است (۴۰). همچنین این‌گونه تصور می‌شود که ویتامین D، نقش مهمی در اتیولوژی و درمان سرطان‌ها ایفا می‌نماید. در مطالعات اخیر نقش کمبود ویتامین D در سرطان‌هایی همچون سرطان پروستات، میلوم مولتیپل، کولورکتال و پستان ثابت شده است (۴۳-۴۱). بنابراین شاید کمبود سطوح ویتامین D در زنان مبتلا به بارداری مولار می‌تواند منجر به پیشرفت و بروز نئوپلازی تروفوبلاستیک بارداری شود.

ویتامین B9 و B12

بر اساس این مروری سیستماتیک در مطالعه هارما و

¹ Malignant Trophoblastic Disease

همکاران (۲۰۰۴)، سطوح ویتامین B12 در زنان مبتلا به بارداری مولار کامل به‌طور معناداری بالاتر و میزان فولات به‌طور معناداری پایین‌تر بود (۳۳). اما در مطالعه کوکائالی و همکاران (۲۰۰۸) میزان فولات به‌طور معنادار در زنان مبتلا به بارداری مولار پایین‌تر و میزان ویتامین B12 میان زنان مبتلا به بارداری مولار و زنان با بارداری سالم مشابه بود (۳۴). بنابراین در مطالعات بررسی شده، فولات نقش حفاظتی در پیشگیری از بارداری مولار داشته است. همچنین فولات و B12 برای سنتز پروتئین و DNA ضروری است (۳۳).

در مطالعه نومورا و همکاران (۱۹۹۸)، گزارش نمودند که غلظت فاکتور اندوتلیال عروقی (VEGF¹) در بارداری-های مولار بالاتر از حاملگی‌های طبیعی است. در واقع ممکن است بین بارداری مولار، نشانگرهای آنژیوژن (VEGF) و آسیب یا اختلال عملکرد اندوتلیال ارتباط وجود داشته باشد. ویتامین B12 و فولات نیز ممکن است در پاتوژنز حاملگی مولار قبل از مرحله جدید عروقی نقش داشته باشند (۴۴)، لذا برای بررسی نقش احتمالی ویتامین B12 و فولات در حاملگی‌های مولی و تأثیر ویتامین B12 و مکمل‌های فولات در این فرآیند، مطالعات آینده‌نگر کنترل شده‌ای با تعداد شرکت‌کنندگان بیشتر مورد نیاز است.

آنتی‌اکسیدان‌ها (ویتامین E و C)

در این مطالعه مروری سیستماتیک، سطوح آنتی‌اکسیدان پلازما در زنان مبتلا به بارداری مولار به‌طور معنی‌داری پایین‌تر و میزان شاخص استرس اکسیداتیو به‌طور معناداری بالاتر بود. بنابراین مکمل‌های آنتی‌اکسیدان همچون ویتامین E و C جهت درمان و پیشگیری از بروز مجدد بارداری مولار توصیه می‌شود (۳۲). در مطالعه کلوسری و همکاران (۲۰۰۹) میزان ویتامین E در بارداری مولار به‌طور معناداری پایین‌تر از زنان بادار و غیرباردار سالم بود (۳۱). در مطالعات مختلف، مکانیسم‌های فرضی استرس اکسیداتیو در مول هیداتیفرم، همچون پره‌اکلامپسی است. در هر دو بیماری جفت منبع اصلی عواملی است که منجر به تغییرات

متابولیکی مشابه می‌شود (۴۵). همچنین عامل اصلی در پاتوژنز بارداری مولار مانند پره‌اکلامپسی، افزایش فاکتورهای استرس اکسیداتیو می‌باشد (۳۲). با این وجود برای توضیح مکانیسم‌های دقیق استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلا به مول هیداتیفرم کامل، مطالعات بیشتری ضروری است.

از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر، نوع مطالعات بررسی شده بود که همگی از نوع مورد شاهدهی بودند و نمی‌توانند به درستی ارتباط علیتی را بین متغیرهای مورد نظر بررسی نمایند. از دیگر محدودیت‌های مطالعه حاضر، تعداد محدود مطالعات در زمینه فولات و آنتی‌اکسیدان‌ها بود که امکان نتیجه‌گیری قطعی را فراهم نمی‌کرد. همچنین با توجه به هتروژنیته بالا میان مطالعات وارد شده، امکان انجام متاآنالیز وجود نداشت. بنابراین پیشنهاد می‌شود مطالعات اولیه‌ای بر اساس نتایج این مروری سیستماتیک طراحی شود تا با استفاده از مکمل‌های تغذیه‌ای همچون ویتامین‌ها بتوان از بروز مجدد بارداری مولار و روند پیشرفت آن پیشگیری نمود و در روند درمان بیماری‌های تروفوبلاستیک بارداری تسریع بخشید.

نتیجه‌گیری

سطوح ویتامین‌های A، D، E، C، B9 و B12 در موارد بارداری مولار کاهش می‌یابد، بنابراین با بررسی و تعیین کمبودهای تغذیه‌ای و ویتامین‌ها در افراد با سابقه بارداری مولار، می‌توان با طراحی کارآزمایی‌های بالینی و تجویز مکمل‌های ویتامینی، از بروز مجدد مول هیداتیفرم در زنان با سابقه آن پیشگیری نمود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش، نتیجه‌ی طرح تحقیقاتی در مرکز تحقیقات مامایی و بهداشت باروری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد اخلاق IR.SBMU.PHARMACY.REC.1399.069 می‌باشد. در این راستا، از همکاری پرسنل مرکز تحقیقات مامایی و بهداشت باروری و دانشکده پرستاری و مامایی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی سپاسگزاری می‌شود.

¹ Vascular Endothelial Growth Factor

1. Savage PM, Sita-Lumsden A, Dickson S, et al. The relationship of maternal age to molar pregnancy incidence, risks for chemotherapy and subsequent pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol* 2013; 33(4):406-411.
2. Seckl MJ, Sebire NJ, Fisher RA, et al. Gestational trophoblastic disease: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 Suppl 6:vi39-vi50.
3. Lurain JR. Hydatidiform mole: Recognition and management. 2019. Available at: <https://www.contemporaryobgyn.net/view/hydatidiform-mole-recognition-and-management>.
4. Farhadifar F, Naseri K, Zandvakili F. Epidemiological survey of gestational trophoblastic disease in Besat Hospital in Sanandaj from 1373 to 1382. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences* 2007; 12(1):32-37.
5. Rezavand N, Seyedzadeh SA. Study of hydatiform mole frequency and some relative risk factors. *Avicenna Journal of Clinical Medicine* 2009; 16(3):27-32.
6. Almasi A, Almassinokiani F, Akbari P. Frequency of molar pregnancies in health care centers of tehran, iran. *J Reprod Infertil* 2014; 15(3):157-160.
7. Suprasert P, Siriaree S, Manopunya M. Outcomes of Metastatic Gestational Trophoblastic Neoplasia: Fourteen Year Experience from a Northern Thailand Tertiary Care Center. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016; 17(3):1357-1362.
8. Koirala A, Khatiwada P, Giri A, Kandel P, Regmi M, Upreti D. The demographics of molar pregnancies in BPKIHS. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 2011; 9(36):298-300.
9. Boufettal H, Coullin P, Mahdaoui S, Noun M, Hermas S, Samouh N. Les môles hydatiformes complètes au Maroc : étude épidémiologique et clinique [Complete hydatiforme mole in Morocco: epidemiological and clinical study]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2011; 40(5):419-429.
10. Ubong IC, Uji AB, Efiok EE, Abeng EG, Felix N. A ten year review of hydatidiform mole in university of Calabar teaching hospital Nigeria. *Journal of Gynecology and Obstetrics* 2015; 3(4):88-91.
11. Shamshiri Milani H, Abdollahi M, Torbati S, Asbaghi T, Azargashb E. Risk Factors for Hydatidiform Mole: Is Husband's Job a Major Risk Factor?. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(10):2657-2662.
12. Giorgione V, Bergamini A, Cioffi R, et al. Role of Surgery in the Management of Hydatidiform Mole in Elderly Patients: A Single-Center Clinical Experience. *Int J Gynecol Cancer* 2017; 27(3):550-553.
13. James DK, Steer PJ, Weiner CP, Gonik B, Robson SC. High-risk pregnancy: management options. 5nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2017.
14. Altieri A, Franceschi S, Ferlay J, Smith J, La Vecchia C. Epidemiology and aetiology of gestational trophoblastic diseases. *Lancet Oncol* 2003; 4(11):670-678.
15. Joneborg U, Eloranta S, Johansson AL, Marions L, Weibull CE, Lambe M. Hydatidiform mole and subsequent pregnancy outcome: a population-based cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 2014; 211(6):681.e1-681.e6817.
16. Sebire NJ, Fisher RA, Foskett M, Rees H, Seckl MJ, Newlands ES. Risk of recurrent hydatidiform mole and subsequent pregnancy outcome following complete or partial hydatidiform molar pregnancy. *BJOG* 2003; 110(1):22-26.
17. Altman AD, Bentley B, Murray S, Bentley JR. Maternal age-related rates of gestational trophoblastic disease. *Obstet Gynecol* 2008; 112(2 Pt 1):244-250.
18. Andreasen L, Christiansen OB, Niemann I, Bolund L, Sunde L. NLRP7 or KHDC3L genes and the etiology of molar pregnancies and recurrent miscarriage *Mol Hum Reprod*. 2013; 19(11):773-781.
19. Gockley AA, Joseph NT, Melamed A, et al. Effect of race/ethnicity on clinical presentation and risk of gestational trophoblastic neoplasia in patients with complete and partial molar pregnancy at a tertiary care referral center. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215(3):334.e1-334.e3346.
20. Fallahian M, Foroughi F, Vasei M, et al. Outcome of subsequent pregnancies in familial molar pregnancy. *Int J Fertil Steril* 2013; 7(1):63-66.
21. Rezavand N, Kamramanesh M, Veisi F, Zangeneh M, Basiri S, Rezaei M. A Survey on Subsequent Pregnancy Outcome after Molar Pregnancy. *Iran J Obstet Gynecol Infertil* 2013; 16(54):1-6.
22. Parazzini F, La Vecchia C, Mangili G, et al. Dietary factors and risk of trophoblastic disease. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158(1):93-99.
23. Lurain JR. Gestational trophoblastic disease I: epidemiology, pathology, clinical presentation and diagnosis of gestational trophoblastic disease, and management of hydatidiform mole. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203(6):531-539.
24. Candelier JJ. The hydatidiform mole, *Cell adhesion & migration* 2016; 10(1-2):226-35.
25. Andrijono A, Muhilal M. Prevention of post-mole malignant trophoblastic disease with vitamin A. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010; 11(2):567-570.
26. Wells GA, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomised studies in meta-analyses; 2000.
27. Berkowitz RS, Bernstein MR, Harlow BL, et al. Case-control study of risk factors for partial molar pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173(3 Pt 1):788-794.
28. Al-Khafaji QA, Alshalah HH, Al-Hilli NM. Study the association of plasma homocysteine, retinol binding protein, pre albumin, and albumin in partial hydatidiform mole. *Biomedicine (India)* 2018; 38(1):120-5.

29. Berkowitz RS, Cramer DW, Bernstein MR, Cassells S, Driscoll SG, Goldstein DP. Risk factors for complete molar pregnancy from a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152(8):1016-1020.
30. Andrijono, Kurnia K, Asikin N. A case-control study of vitamin A level in hydatidiform mole. *Med J Indones* 1997; 6(3):153-7.
31. Kulusari A, Adali E, Kurdoglu M, et al. Catalase activity, serum trace element and heavy metal concentrations, vitamin A, vitamin D and vitamin E levels in hydatidiform mole. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2009; 36(2):102-104.
32. Harma M, Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly* 2003; 133(41-42):563-566.
33. Harma M, Harma M, Kocyigit A, Yurtseven S, Demir N. Serum levels of folate, vitamin B12 and homocysteine in complete hydatidiform mole. *J Reprod Med* 2004; 49(4):285-288.
34. Kokanali MK, Oztürkkan D, Unsal N, Möröy P, Güngör T, Mollamahmutoğlu L. Plasma homocysteine, vitamin B12 and folate levels in hydatidiform moles and histopathological subtypes. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 278(6):531-534.
35. Hasanzadeh M, Ayatollahi H, Ahmadi SH, Namaghi SR. Comparison of serum vitamin D levels in women with gestational trophoblastic neoplasia and healthy women. *Tehran Univ Med J* 2016; 74(4):268-73.
36. Zhang Y, Rishi AK, Dawson MI, Tschang R, Farhana L, Boyanapalli M, et al. S-phase Arrest and Apoptosis Induced in Normal Mammary Epithelial Cells by a Novel Retinoid. *Cancer Research* 2000; 60(7):2025-32.
37. Whitworth JM, Straughn JM Jr, Atigadda VR, Muccio DD, Buchsbaum DJ. The use of retinoids in ovarian cancer: a review of the literature. *Int J Gynecol Cancer* 2012; 22(2):191-198.
38. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39(2):365-379.
39. Avila E, Díaz L, Barrera D, Arranz C, Halhali A, Larrea F. Metabolism of vitamin D in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2007; 103(3-5):781-785.
40. Fernandez-Garcia NI, Palmer HG, Garcia M, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of Id1 and Id2 genes and the angiogenic phenotype of human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2005; 24(43):6533-6544.
41. Alipour S, Hadji M, Hosseini L, et al. Levels of serum 25-hydroxy-vitamin d in benign and malignant breast masses. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(1):129-132.
42. Bouillon R, Eelen G, Verlinden L, Mathieu C, Carmeliet G, Verstuyf A. Vitamin D and cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 102(1-5):156-162.
43. Morales-Oyarvide V, Meyerhardt JA, Ng K. Vitamin D and Physical Activity in Patients With Colorectal Cancer: Epidemiological Evidence and Therapeutic Implications. *Cancer J* 2016; 22(3):223-231.
44. Nomura S, Okamoto T, Matsuo K, et al. Serum and tissue vascular endothelial growth factor levels in hydatidiform mole. *Life Sci* 1998; 63(20):1793-1805.
45. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222(3):222-235.