

IDUNAS	NATURAL & APPLIED SCIENCES JOURNAL	2021 Volume:3 Special Issue, No:14
---------------	---	---

Dokularda Ultrasonla Sıcaklık Ölçümü ve Çok Katmanlı Dokularda Dönüş Sinyallerinin Sıcaklıkla Değişimi

Mustafa Uyğun^{1*} , M. Serhan Küçükca² 

¹ Biyomedikal Teknolojiler ABD, Fen Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye

² Makina Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Author E-mails

mustafauygun9@gmail.com

*Correspondence to: Mustafa Uyğun, Biyomedikal Teknolojiler ABD, Fen Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, Türkiye

ÖZET

Tümörlü dokular ısı terapi yöntemleri ile tedavi edilebilmektedir. Ancak bu uygulamalarda dokuların gerekli ısı doza maruz bırakılması gerekmektedir. Tedavi sırasında gerekli ısı dozunu uygulananı uygulanmadığı sıcaklık görüntüleme yöntemleri ile tespit edilebilir. Çalışmada ultrasonik sıcaklık ölçüm yöntemi incelenmiştir. Belirli bir sıcaklık artışı sonrasında doku ses hızı değişmekte ve ısı genleşme mekanizması devreye girmektedir. Böylelikle doku içerisindeki arayüzlerin konumu değişmekte ve ilk durum ve ikinci durumda, arayüzden meydana gelen geriye dönüş zamanları değişmektedir. Bu zaman kaymasının tespit edilmesi ve doku termoakustik özellikleri ile ilişkilendirilmesi sonucunda sıcaklık tahmini gerçekleştirilmektedir. Çalışmada çok katmanlı, katmanlar arası homojen bir model ile birlikte tek katmanlı ancak katmanlar arası heterojen bir model oluşturularak tek boyutlu ortamda akustik benzetim gerçekleştirilmiştir. Benzetim sonuçlarında elde edilen sinyaller kullanılarak sıcaklık tahmin algoritması çalıştırılmış ve yöntem sınanmıştır. Çalışma sonucunda kabul edilebilir sıcaklık değişim tahminleri yapılmış ancak bazı noktalarda zaman kayması tahmininde hatalar olduğu gözlemlenmiş ve hataların nedenleri incelenmiştir. Çalışma, ileriki çalışmalar için temel olup 1 boyutlu şemada tutarlı sonuçlar alınmıştır. İleriki çalışmalarda sanal doku fantomu gerçek bir dokuya yakınlaştırılacak, bir ve çok boyutlu ortamda sıcaklık tahmin algoritmaları bu fantom üzerinde çalışılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Ultrason, ultrason ile sıcaklık ölçümü, ultrasonik sıcak değişim benzetimi.

1. GİRİŞ

Isıl tedavi yöntemleri doku içerisinde bulunan iyi ve kötü huylu tümörlerin küçültülmesi veya yakılması amacıyla sıklıkla uygulanmaktadır. Bunların yanı sıra fizik tedavide ağrı hafifletme amacıyla kullanılmaktadır. Tümör uygulamalarında tedavinin başarılı olması için ilgilenilen bölgenin belirli bir süre boyunca, belirli bir sıcaklıkta tutulması gerekmektedir. Böylelikle ablasyon ya da küçültme için gerekli ısı doz dokuya uygulanmaktadır.

Tedavi öncesinde dokunun ulaşması gereken sıcaklık dağılımı veya bu sıcaklık dağılımı için uygulanması gereken güç biyosı yaklaşımları kullanılarak tespit edilebilir. Tedavi sırasında ise dokunun istenilen sıcaklığa ulaşip ulaşmadığı sıcaklık görüntüleme yöntemleri ile tespit edilebilir. Doku içi sıcaklık ölçümleri ısı çift ve optik uçlar ile girişimsel olarak yapılabildiği gibi Manyetik Rezonans (MR) veya Ultrason (US) sıcaklık ölçüm yöntemleri ile girişimsiz olarak gerçekleştirilebilir.

US sıcaklık ölçümü ile MR sıcaklık ölçümünün birbirleri üzerine üstünlükleri bulunmaktadır. MR sıcaklık ölçümü mutlak sıcaklık ölçümü sağlaması ve ultrasona göre düşük gürültü değerlerine sahip olması açısından avantajlıdır. Ancak, yöntem geniş bir donanım gerektirmektedir ve son ürün maliyetleri yüksektir. Ultrason görüntüleme ise mutlak sıcaklık yerine, bölgedeki sıcaklık değişimini tahmin etmektedir ve yüksek gürültü değerlerine sahiptir. Bunlara rağmen görece küçük hacimli donanıma sahip olması nedeniyle taşınabilir sistem olarak tasarımı yapılabilir ve görece düşük son ürün maliyetleri ile ön plana çıkmaktadır.

Bu çalışmada US sıcaklık görüntüleme incelenmiştir. Bu yöntemde, bir arayüzden geri dönen dalgaının her iki sıcaklık dağılımındaki geri dönüş zamanları karşılaştırılmakta ve zaman kayması değerleri bulunmaktadır. Hesaplanan zaman kayması doku termoakustik profili ile ilişkilendirilerek sıcaklık tahmini gerçekleştirilmektedir. Çalışmada, bilgisayar ortamında sanal fantom modelleri oluşturulmuş ve iki farklı sıcaklık dağılımı için fantomlarda akustik benzetim gerçekleştirilmiştir. Benzetim sonuçlarından alınan sinyaller değerlendirilerek, literatürde bulunan sıcaklık tahmin modeli ile sıcaklık ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Ultrasonik sıcaklık ölçümüne dair öncül çalışmada, Seip ve Ebbini (1995) iki farklı sıcaklık dağılımında alınan sinyallerin spektrumunu çıkartmış ve bu spektrumlardaki maksimum değer veren temel frekans ve onun harmoniklerini tespit etmiştir. Temel frekanstaki kaymayı saçıcılar arasındaki ortalama uzaklığın değişimi ile ilişkilendirilerek ve ısı genleşme etkisinden yola çıkarak sıcaklık tahminleme

yapmıştır. Simon vd. (1998) genel olarak bugün kullanılan zaman kayması tabanlı sıcaklık tahmin formülasyonunu gerçekleştirmiş ve ölçüm prosedürünü ortaya koymuştur. Çalışmada ölçümde hataya neden olan ısı lens etkisini vurgulanmıştır. Zaman kaymasının yanı sıra geri dönüş enerjisindeki değişim (Arthur vd., 2003) ve fotoakustik etki dolayısıyla doku tarafından üretilen dalgadaki değişimin (Shah vd., 2008) tespit edildiği farklı ultrasonik sıcaklık tahmin yöntemleri bulunmaktadır.

Anand vd. (2007), Simon vd. (1998) deneysel olarak akustik fantomda sıcaklık tahmini yapmıştır. Ayrıca literatürde ex-vivo çalışmalar bulunmaktadır. Techavipoo vd. (2002) ex-vivo köpek dokularında sıcaklığa bağlı akustik karakterizasyon gerçekleştirmiş ve sıcaklığa bağlı zaman kaymalarını incelemiştir. Varghese vd. (2002) ısıtma uygulaması sonucunda; domuz dokusu üzerinde ex-vivo ve canlı domuz kası üzerinde in-vivo çalışma gerçekleştirmiştir. Literatürde bugüne kadar gerçekleştirilen sıcaklık ölçümleri tek bir doku katmanı için gerçekleştirilmiştir.

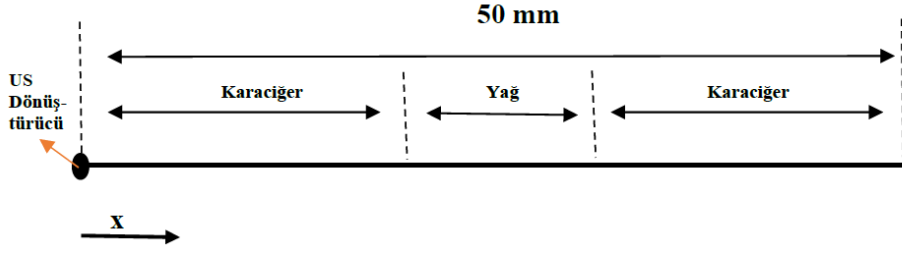
3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışma iki bölümden oluşmaktadır. İlk bölümde doku benzeri bir ortamı taklit eden sanal fantom oluşturulmuş ve bu fantom üzerinde iki farklı sıcaklık dağılımına ait ultrasonik alanın bilgisayar benzetimi gerçekleştirilmiştir. İkinci bölümde, bu benzetimden elde edilen sinyaller değerlendirilmiş ve ultrasonik sıcaklık tahmini gerçekleştirilmiştir.

3.1. Ultrasonik Benzetim

Dokuyu taklit eden iki farklı sanal fantom modeli oluşturulmuş ve üzerlerinde ayrı ayrı olmak üzere benzetim gerçekleştirilmiştir. İlk sette saçıcı etkiler incelenmeden üç katmanlı, katmanlar içinde homojen bir sanal doku modeli, ikinci sette tek katmanlı ancak katman içerisinde yağ saçıcılarının olduğu heterojen sanal doku modeli oluşturulmuştur. Sanal dokuların geometri modellerinin oluşturulması ve üzerlerine termoakustik parametrelerin tanımlanması Matlab platformunda gerçekleştirilmiştir. Benzetimdeki sıcaklık dağılımları T_1 üniform olarak $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve T_2 üniform olarak $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak kabul edilmiştir.

Her iki doku modeli Matlab ortamında, 50 mm uzunluğunda hesaplama alanı olarak tasarlanmıştır (Matlab, 2020). Hesaplama alanı 2000 eşit parçaya bölünerek Δx uzunluğu 50×10^{-3} mm olmak üzere grid yapısı oluşturulmuştur. 1 numaralı grid noktasına ultrasonik dönüştürücü işlevini yapması için US kaynak ve sensör tanımlanmıştır. Üç katmanlı doku modeli Şekil 1'de verilmiştir. Burada ilk katman 20 mm uzunluğunda karaciğer dokusu, ikinci katman 10 mm uzunluğunda yağ dokusu ve üçüncü katman 20 mm uzunluğunda karaciğer dokusu olarak tanımlanmıştır.



Şekil 1. Hesaplama alanı.

Tek katmanlı heterojen doku modelinde, 50 mm hesap alanının tamamı tek bir doku katmanı olarak oluşturulmuştur. Hesaplama alanı içerisine, toplam grid sayısının yüzde onu kadar ve eşit aralıklarla yerleştirilmiş noktalar seçilmiş ve bu noktalar akustik saçıcı olarak tanımlanmıştır. Akustik saçıcı özelliği sağlanması için bu noktalara yağ dokusu özellikleri tanımlanmıştır. Geri kalan noktalara ise karaciğer dokusu özellikleri tanımlanmıştır.

Doku bölgesi ve saçıcılara ait termoakustik özellikler Tablo 1’de verilmiştir, (Duck, 1990). Grid yapısının sabit tutulması nedeniyle ısıl genleşme dolaylı yoldan dokuya tanımlanmıştır. Doku bölgesine tanımlanacak indirgenmiş ses hızı profili, ısıl genleşme etkisinin gerçek ses hızı profiline yerleştirilmesiyle oluşturulmuştur.

Tablo 1. Doku özellikleri.

Doku	Ses Hızı (37°C)	dc/dt	Yoğunluk (37°C)	dro/dt	Isıl Genleşme	Akustik Soğurma	Kaynak
Karaciğer	1578	1	1050	-0.315	10^{-4}	0.5	Duck (1990)
Yağ	1436	-3	928	-0.8909	3.2×10^{-4}	0.5	Duck (1990)
Karaciğer (indirgenmiş)	1578	0.8422	1050	-0.315	10^{-4}	0.5	Duck (1990)

Benzetimde 3 periyot uzunluğunda 1 MPa pik – pik genliğinde ve 8.5 MHz frekansında, ultrason atımı bir numaralı grid noktası üzerine uygulanmıştır. Zaman adımını belirlemek adına CFL şartı olarak 0.005 parametresi kullanılmıştır. Akustik benzetimler, Matlab üzerinde çalışan k-Wave araç kutusu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (k -Wave, b.t.; Treeby ve Cox, 2010).

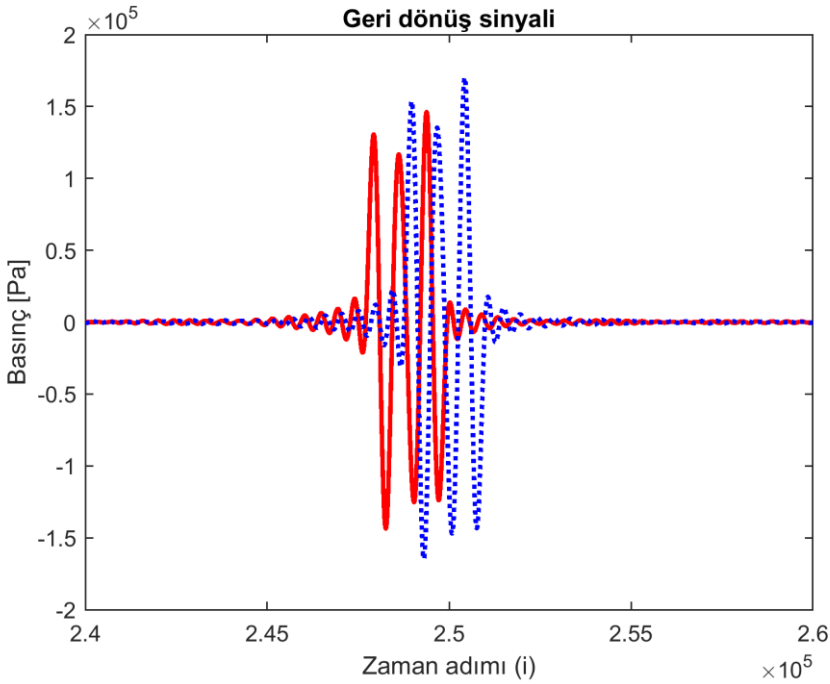
3.2. Ultrasonik Sıcaklık Tahmini

Sıcaklık değişimi sonucunda ses hızında değişim meydana gelmektedir. Ayrıca ısıl genleşme sonucunda yansıtıcı arayüzlerin konumu bir miktar değişmektedir. Bu nedenle sıcaklık değişimi sonrasında

yeniden alınan US görüntüsünde yansıtıcı arayüzlerin geri dönüş zamanları bir miktar kaymaktadır. Meydana gelen bu zaman kayması Denklem 1’de verilmiştir.

$$\delta t(z) = t_2(z) - t_1(z) \tag{1}$$

Burada $t_1(z)$, z derinliğinde bulunan bir anatomik noktanın ilk sıcaklık dağılımında alınan sinyaldeki uçuş zamanı, $t_2(z)$ ise aynı anatomik noktanın ikinci sıcaklık durumunda alınan sinyaldeki uçuş zamanıdır. Zaman kaymaları sinyal üzerinde çapraz korelasyon ya da farkların kare toplamı gibi yöntemlerle bulunmaktadır. Örnek bir zaman kayması Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 2. Örnek Zaman kayması.

Denklem 2 kullanılarak ses hızı profil katsayısı β değerlerinin bulunması ve zaman kayması değerleri ile birlikte Denklem 3’te yerine koyulmasıyla beraber yerel noktanın sıcaklık değişim tahmini gerçekleştirilmektedir, (Simon vd., 1998).

$$\beta(z) = \frac{1}{c_0(z)} \left. \frac{\partial c(z,T)}{\partial T} \right|_{T=T_0} \tag{2}$$

$$\delta T(z) = \frac{c_0(z)}{2} \left(\frac{1}{\alpha(z) - \beta(z)} \right) \frac{\partial}{\partial z} \delta t(z) \tag{3}$$

Denklem 3’te c_0 , dokunun ilk durumdaki ses hızı değeri, α ısıl genişleme katsayısı ve β doku ses hızı değişim katsayısıdır. Ayrıık zamanda gerekli cebirsel işlemlerin yapılmasıyla birlikte sıcaklık değişim tahmin denklemi Denklem 4’teki gibi olmaktadır.

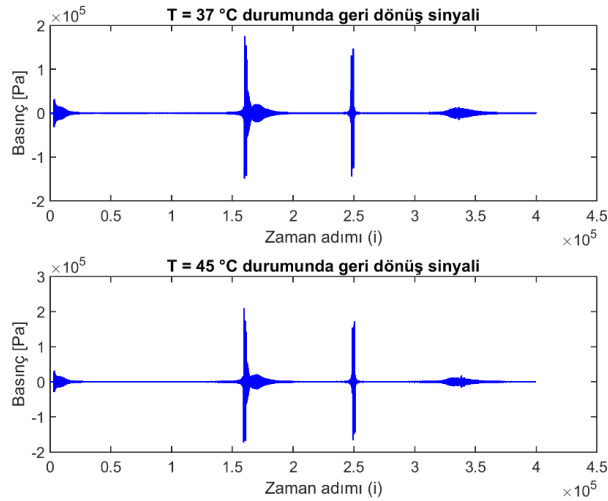
$$\Delta T(i) = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{\alpha(i) - \beta(i)} \right) \frac{\Delta \delta(i)}{\Delta i} \quad (4)$$

Burada en sağdaki $\Delta \delta(i)/\Delta i$ terimi, zaman kayması – zaman adımı verisinde zaman kaymasına fark şeması uygulanmasıyla bulunmaktadır. Diğer iki terim ise dokudaki bir i noktası için sabit olup termoakustik özelliklere bağlıdır.

4. SONUÇ

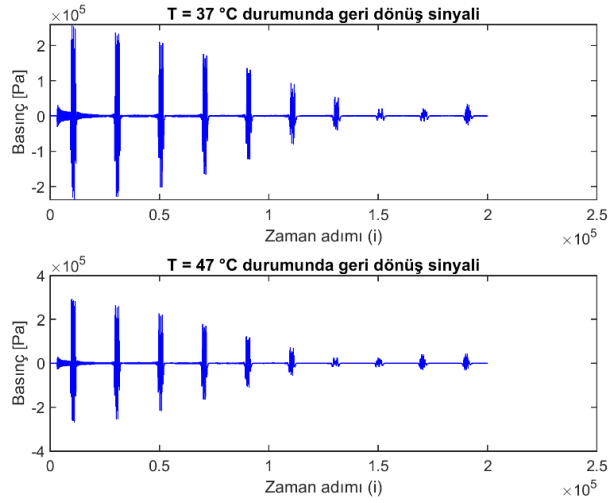
Her iki benzetim seti sonuçları 6.312 GHz örnekleme frekansında alınmıştır. Üç katmanlı, homojen doku modeli benzetimi sonucunda elde edilen sinyal Şekil 3’te verilmiştir. Sinyal üzerinde sadece pik noktaları üzerinde çapraz korelasyon gerçekleştirilmiş ve yerel zaman kaymaları sırasıyla 680 ve -1046 olarak ölçülmüştür. Teorik olarak bu bölgelerde bulunması beklenen zaman kaymaları 671.6 ve -1045.7’dir. İki saçıcı bu tahminde maksimum hata yaklaşık %1,2 mertebesindedir. Bölgelerin termoakustik özelliklerinin öncül olarak bilinmesiyle, saçıcı noktalardaki sıcaklık tahminleri 44,94 °C ve 45,15 °C olmaktadır. Teorik değerler alındığında olması gereken sıcaklık değerleri ise 44,84 °C ve 45,11 °C’dir.

Geri fark şeması uygulanıp, zaman kaymalarının eksanel türevi alındığında karaciğer ve yağ dokularının birbirlerinden farklı ve ters işaretli eğime sahip olduğu görülmektedir. Böylelikle, özellikle üniform sıcaklık dağılımlarında bu eğim farkı tespit edilerek katman bölütleme işlemi gerçekleştirilebilmektedir.



Şekil 3. Çok katmanlı doku modeli benzetim sonucu.

Tek katmanlı heterojen doku modeli benzetim sonucunda elde edilen ultrason sinyali Şekil 4’te verilmiştir. Saçıcılara denk gelen pik noktalarında çapraz korelasyon gerçekleştirilmiştir. Çapraz korelasyon sonucunda elde edilen zaman kayması değerleri teorik değerlerle karşılaştırılmış ve Tablo 1’de verilmiştir.



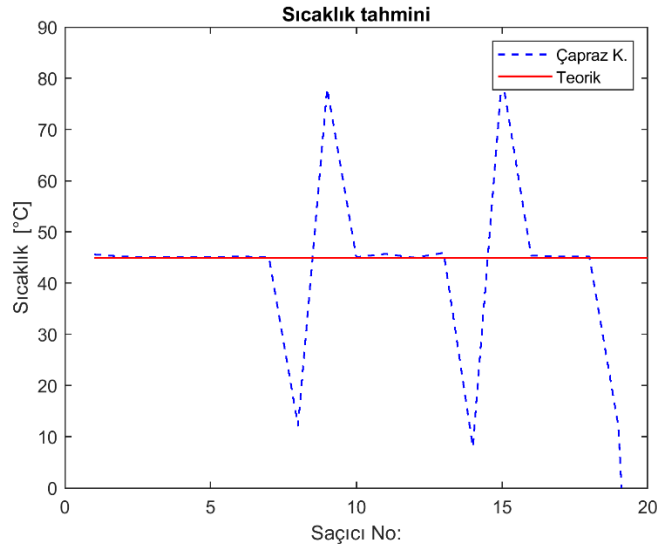
Şekil 4. Tek katmanlı heterojen doku modeli benzetim sonucu.

20. saçıcıya ait nokta çapraz korelasyon algoritmasının sağ kenar sinyalde hatalı çalışması üzerine değerlendirmede dışlanmış ancak tabloda verilmiştir. Yüzdesel hata 1. Nokta'da %7,97 ve istisnai durum olan 8, 14, 19 Noktalarda %20 üzeri olup kalan diğer noktalarda %5 altındadır. Serpiştirilmiş saçıcılar nedeniyle doku içinde çoklu yansımalar gerçekleşmektedir. Bunun sonucunda her saçıcı bölgesine denk gelen pik civarındaki sinyal parçacığında farklı girişim desenlerinin meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca sıcaklığın değiştirilmesi sonucunda aynı bölgeden alınan sinyalde desenlerinde de farklılaşma olduğu görülmüştür. Bu nedenle 8, 14, 19. Noktalarda zaman kayması ölçümünde %20 ve üzerinde hatalar gözükmemektedir.

Tablo 2. Zaman kayması değerleri.

Saçıcı No:	1	2	3	4	5
Çapraz Kor.	-36	-114	-191	-268	-345
Teorik	-33,34	-109,20	-185,06	-260,92	-336,78
% Hata	7,97	4,39	3,21	2,71	2,44
Saçıcı No:	6	7	8	9	10
Çapraz Kor.	-423	-500	-264	-655	-732
Teorik	-412,64	-488,50	-564,36	-640,22	-716,08
% Hata	2,51	2,35	53,22	2,31	2,22
Saçıcı No:	11	12	13	14	15
Çapraz Kor.	-815	-891	-976	-700	-1113
Teorik	-791,94	-867,80	-943,66	-1.019,51	-1.095,37
% Hata	2,91	2,67	3,43	31,34	1,61
Saçıcı No:	16	17	18	19	20
Çapraz Kor.	-1193	-1271	-1349	-1110	256
Teorik	-1.171,23	-1.247,09	-1.322,95	-1.398,81	-1.474,67
% Hata	1,86	1,92	1,97	20,65	117,36

Sıcaklık tahmin algoritması sonucu elde edilen sıcaklık değerleri Şekil 5’te verilmiştir. Çapraz korelasyon sonuçları, teorik olarak hesaplanan değerler ile karşılaştırılmıştır. Zaman kayması değerleri, girişim etkilerinden dolayı 8, 14 ve 19. Noktalarda hatalı olarak elde edilmiştir. Bu nedenle bu noktalarda ve sıcaklık tahmin algoritmasında kullanılan fark şeması nedeniyle de bu noktaların bir sonraki noktalarında hatalı ölçümler alınmıştır.



Şekil 5. Sıcaklık tahmini.

5. TARTIŞMA

Çalışmada, literatürde verilen model test edilmiş ve 1 boyutlu şemada sonuçların tutarlı olduğu görülmüştür. Zaman kayması grafiği kullanılarak çok katmanlı dokularda doku ayırım noktalarının tespit edilebileceği görülmüştür. Tek katmanlı heterojen modelde geometrinin bazı noktalarında, zaman kayması değerlerinin bulunması aşamasında hatalar meydana geldiği ve bunun sonucunda sıcaklık değişim tahmininde sapmalar oluştuğu görülmüştür.

İlk sıcaklık dağılımındaki yerel girişim örüntüsü, hesaplama alanında tanımlanan saçıcı dağılımı, frekans, sinyal uzunluğu gibi değişkenlere bağlıdır. Bunun yanı sıra sıcaklık değişimi sonrasında yerel dalgacık formunda değişim meydana gelmektedir. Zaman kayması tespitindeki hata bu şekilde yerel dalga deseninde meydana gelen farklılıklar sonucu ortaya çıkmaktadır.

Çapraz korelasyon (ÇK) algoritması iki dalga arasındaki benzerliği, bir sinyali sabit tutup diğer sinyali kaydırırken, her kaydırma adımında sinyalleri çarparak, her kaydırma adımı için ÇK katsayısını

hesaplamaktadır. Çapraz korelasyon algoritması, ÇK katsayısının maksimum olduğu kaydırma adımını zaman kayması değeri olarak döndürmektedir. Sıcaklık artışı öncesi ve sonrasındaki sinyallerin profilleri arasındaki farklılıklar ÇK algoritmasının olması gerekenden farklı bir değer döndürmesine neden olmaktadır. Özellikle iki sinyaldeki eşdeğer bölgelerin birinin pozitif değerler alması, diğerinin de negatif değerler alması sonucunda bu kaydırma adımı için ÇK katsayısı diğer kaydırma adımlarına göre daha düşük değerler alabilmektedir. Bu nedenle dalgacık formlarındaki ÇK katsayısına etkileri algoritma içerisinde değerlendirilmelidir.

Şu ana kadar olan sonuçlar eşit aralıklı saçıcıya sahip basit bir doku modeli için olup ilgili girişim desenleri bu geometriye özgüdür. Farklı bir saçıcı modeli ve geometri sonucunda, iki sinyalin girişim desenleri arasındaki farklılıklar değişebilecektir. Öncelikle sanal doku modeli gerçek dokuya yansıtıcılık açısından daha tutarlı şekilde yaklaştırılmalıdır. Şu anki çalışma basit bir saçıcı modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlerleyen çalışmalarda dokuyu daha iyi modelleyecek bir saçıcı modeli oluşturularak sanal fantomun dokuya daha benzeyecek hale getirilmesiyle, tek ve çok boyutlu ortamda analizler gerçekleştirilecektir. Tek boyutlu benzetim hesaplama gücü için avantajlı olsa da sadece arayüze normal açıdan gelen sinyalleri modellemektedir. Çok boyutlu etkilerin değerlendirildiği benzetim sonucunda hesaplanan akustik alanda, dokunun hem benzetim hem de sıcaklık tahmin algoritması açısından daha iyi modelleneceği beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Anand, A., Savery D., ve Hall, C. (2007). Three-dimensional spatial and temporal temperature imaging in gel phantoms using backscattered ultrasound, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 54(1), 23-31.
2. Arthur, R. M., Straube, W. L., Starman, J. D., ve Moros, E. G. (2003). Noninvasive temperature estimation based on the energy of backscattered ultrasound, *Medical Physics*, 30(6), 1021-1029.
3. Duck, F. A. (1990). *Physical properties of tissue: a comprehensive reference book*. Londra: Academic Press. k -Wave. (b.t.). A MATLAB toolbox for the time-domain simulation of acoustic wave fields. <http://k-wave.org> adresinden alındı.
4. MATLAB. (2020). R2020a, Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.
5. Seip, R., ve Ebbini, E. S. (1995). Noninvasive estimation of tissue temperature response to heating fields using diagnostic ultrasound, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 42(8), 828-839.
6. Shah, J., Park, S., Aglyamov, S. R., Larson, T., Ma, L., Sokolov, K. V., Johnston, K. P., Milner, T. E., ve Emelianov, S. Y. (2008). Photoacoustic imaging and temperature measurement for photothermal cancer therapy, *J. Biomed. Opt.* 13(3), 034024.
7. Simon, C., VanBaren, P., ve Ebbini, E. S. (1998). Two-dimensional temperature estimation using diagnostic ultrasound, *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, 45(4), 1088–1099.

8. Techavipoo, U., Varghese, T., Zagzebski, J. A., Stiles, T., ve Frank G. (2002). Temperature dependence of ultrasonic propagation speed and attenuation in canine tissue, *Ultrasonic Imaging*, 24(4), 246-260.
9. Treeby, B. E., ve Cox, B. T. (2010). k-Wave: MATLAB toolbox for the simulation and reconstruction of photoacoustic wave-fields, *J. Biomed. Opt.*, 15(2), 021314.
10. Varghese, T., Zagzebski, J. A., Chen, Q., Techavipoo, U., Frank, G., Johnson, C., Wright, A., ve Lee, F. T. (2002). Ultrasound monitoring of temperature change during radiofrequency ablation: preliminary in-vivo results, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 28(3), 321-329.