

AKUT VE KRONİK VİRAL HEPATİTLİ HASTALARDA LİPİD PEROKSİDASYONU VE OKSİDASYONA DİRENCİN İNCELENMESİ

Birgül KAÇMAZ*, Elmas ÖĞÜŞ, Hatice PAŞAOĞLU**, Dilek KILIÇ***, Necla TÜLEK*, Fatih BAKIR****

*** S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları Klinik Mikrobiyoloji Bölümü**

**** Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü, Cebeci, Ankara, Türkiye**

***** Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD**

Özet

Son yıllarda hepatik hasar ve fibrozisle sonuçlanan çeşitli karaciğer hastalıklarının patogeneğinde artan serbest radikallerin etkisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır.

Bu çalışma, akut hepatit B (n: 22), kronik hepatit B (n: 8) ve kronik hepatik C'li (n: 7) hastalarda lipid peroksidasyonu ve oksidasyona direnç araştırılmak üzere planlanmıştır. Elde edilen sonuçlar sağlıklı kontrol grubuyla (n: 32) karşılaştırılmıştır.

Kontrol grubuna göre tüm hasta gruplarında anlamlı yüksek malondialdehit (MDA) düzeyleri tespit edildi. Yüksek ALT düzeyleri ile MDA arasında korelasyon saptananakzen ($r: 0.192, p>0.05$), yüksek AST düzeyleri MDA arasında anlamlı korelasyon saptandı ($r: 0.453, p>0.05$).

Kronik HBV ve HCV'li hasta grubunda oksidasyona direnci, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Akut viral hepatit B'li hastaların oksidasyona direnci, diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$).

Sonuç olarak, bir ön çalışma olarak bu bulgular, serbest oksijen radikalleri ve antioksidan sistemin viral hepatit patogeneğinde rol aldığı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Serbest oksijen radikalleri, hepatit B, hepatit C.

Summary

In recent years, there are a lot of studies predicting the free oxygen radicals in pathogenesis of liver diseases.

In this study, lipid peroxidation and resistance to oxydation was investigated in the patient with acute hepatitis B (n: 22), chronic hepatitis B (n: 8) and C (n: 7) and the results were compared to healthy controls (n: 32).

In all patients, plasma malonel aldehyd (MDA) levels were found significantly higher than that of controls. Whereas there was no correlation between MDA and ALT levels ($r=0.192, p>0.05$), it was found significantly correlation between MDA and AST levels ($r=0.453, p<0.05$).

When we was compared the chronic hepatitis groups according to the oxidation resistance, we couldn't find any differance ($p>0.05$), but it was significantly high in acute hepatitis B patients ($p<0.05$).

Despite that these were a preliminary study, we can suggest that free oxygen radicals and antioxidant system may play a role in pathogenesis of liver diseases.

Key Words: Free oxygen radicals, hepatitis B, hepatitis C.

Giriş ve Amaç

Hepatik hasar ve fibrozisle sonuçlanan çeşitli karaciğer hastalıklarının patogeneğinde serbest radikaller ve lipid peroksidleri giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Serbest radikaller, hemen tüm hücre bileşenlerini etkileyebilmektedir.

Hücre membranlarının önemli bir bileşeni olan poliansature yağ asitleri serbest oksijen radikallerine bağlı olarak lipid peroksidasyonuna (LP) uğrar. LP'nin ise hepatosit zedelenmesinin ana nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. LP'nin aldehitik ürünlerinden olan malondialdehitin, kollagen gen ekspresyonunu ve üretimini artırdığı gösterilmiştir. Diğer taraftan bu aldehitik ürünlerin profibrogenetik sitokinleri (transforming growth faktör- β 1 (TGF- β 1) gibi salan Kupffer hücrelerini de aktive ettiği bilinmektedir. İzole perfüze karaciğer, izole hepatositler ve subsellüler organeller üzerinde yapılan çeşitli araştırmalar serbest oksijen radikallerinin karbonhidratlara, lipidlere, proteinlere ve DNA'ya hasar verdiğini, sonuçta hücre fonksiyon ve bütünlükte bozulmaya neden olduğunu göstermiştir. Bu yüzden serbest radikallerin karaciğer hastalıklarındaki ve hepatik fibrozisteki rolü geniş olarak incelenmiştir (1, 2).

Bu çalışmada akut hepatit B, kronik hepatit B ve C'li hastalarda lipid peroksidasyonu (LP) ve oksidasyona direnç araştırılmıştır. Bu amaçla akut viral hepatit B, kronik hepatit B ve C tanısı almış hastalar çalışmaya alınmış, sonuçları sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yapılmıştır. Çalışma gruplarımız Eylül 1999-Şubat 2000 tarihleri arasında hastanemizin İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Polikliniği'ne başvuran viral hepatit tanısı almış hastalardan oluşmuştur. Hastalar akut viral hepatit B, kronik hepatit B, kronik hepatit C olmak üzere gruplandırılmıştır.

Akut viral hepatit B grubuna; yeni semptomları olan, başvurularında karaciğer enzimlerinden ALT ve AST'de en az 4-5 kat kadar yükseklik tespit edilen, HbsAg ve anti Hbc IgM pozitifliği saptanan hastalar alınmıştır.

Kronik hepatit B grubuna; altı aydan uzun süreli HBsAg ve beraberinde, HBeAg veya anti-HBe, anti-Hbc total pozitifliği olan, ALT ve AST değerlerinde yükseklik bulunan ve histopatolojik olarak kronik hepatit tanısı almış hastalar seçilmiştir.

Kronik hepatit C grubuna; altı aydan uzun süreli anti-HCV pozitifliği, ALT ve AST düzeylerinde dalgalanmalar olan hastalar alınmıştır.

Antioksidan tedavi alanlar (E vitamini, C vitamini), sigara, alkol kullananlar, eşlik eden kronik hastalığı olanlar (diabet, kalp hastalığı gibi) çalışmaya alınmadı. Kontrol grubu ise sağlıklı kişilerden, hastaların yaş ve cinsiyet grubuna uygun olarak seçildi.

Hastalar ve kontrol grubundan sabah aç durumda iken EDTA'lı tüpe 2.5 cc venöz kan örnekleri alınmış, iki saat içinde santrifüj ile plazması ayrılarak ve çalışılacak güne kadar -20°C'de dondurularak saklanmıştır. Eş zamanlı olarak ALT (Alanin aminotransferaz), AST (Aspartat aminotransferaz) ölçümleri biyokimya laboratuvarı ILAB 1800 otoanalizöründe yapıldı. Hepatit markerları (HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, anti-Hbc total, anti-Hbc IgM ve anti-HCV) ELISA laboratuvarında AXSYM cihazıyla Abbot kiti kullanılarak çalışıldı.

Hunter Yöntemi İle Lipid Peroksid Ölçümü

Prensip: Bu çalışmada Hunter ve arkadaşları tarafından geliştirilen metod kullanıldı (3). Temel prensip lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerin tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) denen molekülleri oluşturmasıdır. Bu moleküllerin oluşturduğu pembe renkli kompleks 530 nm'de maksimum absorbanans vermektedir.

Serumların oksidatif strese uğratılmaları sonucunda MDA ölçümü:

Bu amaçla Agil ve arkadaşları tarafından tarif edilen yöntem kullanılmıştır (4). Hasta ve kontrol gruplarının total antioksidan düzeylerini ölçmek amacıyla serumlar oksidasyona uğratılmış ve sonunda lipid peroksidasyon düzeylerinin ölçümü yapılmıştır. Böylece hastalarda lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşma miktarı ile lipid peroksidasyonuna direnç arasındaki negatif korelasyondan yola çıkarak hastalardaki total antioksidan durum hakkında yorum yapmak

amaçlanmıştır. Hasta örneklerinin oksidatif strese maruz bırakılmaları amacıyla 1 ml serum üzerinde 10 µmol/L konstansrasyonda 50µL bakır sülfat ve 300 ml/L konsantrasyonda 50 µL hidrojen eklendi. Daha sonra her bir örnek 37°C'lik su banyosunda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında MDA değerleri Hunter yöntemi ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlar standartlarla elde edilen optik dansite-standart eğrileriyle karşılaştırılarak örneklerin oksidasyona olan direnci bulundu.

Hastaların oksidasyon öncesi MDA ve oksidasyon sonrası MDA düzeyleri akut hepatit B, kronik hepatit B, kronik hepatit C grupları arasında ve kontrol grubuyla karşılaştırıldı.

İstatiksel Analiz

Veriler, SPSS for Windows (Real State Corporation, İngiltere) programına girilmiş ve aynı programda istatistiksel analizleri yapılmıştır. Analizde student's t testi, Mann-Whitney U testi, korelasyon ve regresyon analizi yapılmıştır.

Bulgular

Hasta ve kontrol grubunun yaş, cinsiyet dağılımı Tablo 1'de verilmiştir. Hastaların ve kontrol grubunun LP değerleri Tablo 2 ve Şekil 1'de gösterilmiştir. Gruplar arası oksidasyon öncesi LP değerleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre tüm hasta gruplarında LP düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$). Akut viral hepatit B'li hastalarla LP düzeyleri, diğer hasta gruplarından anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p < 0.05$), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Oksidasyon sonrası LP değerlerine göre, akut viral hepatit B'li hastaların diğer gruplara göre anlamlı olarak oksidasyona direnci düşük bulundu ($p < 0.05$). Diğer gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Hastaların ve kontrol grubunun karaciğer enzim düzeyleri ortalaması Tablo 3'te gösterilmiştir. Akut viral hepatit B'li hastaların ALT düzeyleri ile oksidasyon öncesi LP değerleri ($r = 0.394$, $p > 0.05$) ve oksidasyon sonrası LP değerleri ($r = -0.192$, $p > 0.05$) arasında korelasyon bulunmamıştır. Yine akut viral hepatit B'li hastaların AST düzeyleri ile oksidasyon öncesi LP değerleri arasında pozitif korelasyon bulunurken ($r = 0.453$, $p < 0.05$) oksidasyon sonrası LP değerleri arasında korelasyon bulunmamıştır. KHC'li hastaların karaciğer enzimleri ile oksidasyon öncesi LP ve oksidasyon sonrası LP değerleri arasında korelasyon bulunmamıştır ($r = 0.112$, $p > 0.05$, $r = 0.137$, $p > 0.05$). KHB'li hastaların karaciğer enzimleri ile oksidasyon öncesi ($r = 0.035$, $r = 0.034$, $p > 0.05$) ve oksidasyon sonrası ($r = -0.584$, $r = -0.609$, $p > 0.05$) LP değerleri arasında korelasyon bulunmamıştır.

Tartışma ve Sonuç

Hepatit B ve hepatit C infeksiyonları sırasında oluşan karaciğer hücre hasarının kronikleşmesinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Yine kronikleşme ve asemptomatik infeksiyonların gelişimi ile ilgili veriler de yeterli değildir. Son yıllarda hepatik hasar ve fibrozisle sonuçlanan çeşitli karaciğer hastalıklarının patogeneğinde artan serbest radikallerin etkisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır (1). Serbest radikaller tarafından başlatılan LP'nu çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonunu içeren oldukça zararlı bir reaksiyondur. LP başladıktan sonra kendini devam ettiren bir zincir reaksiyonu şeklinde sürer. LP, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu aldehit bileşiklerden olan MDA, membran komponentlerinin polimerizasyonu ve çapraz bağlanmasına neden olur. Bu aldehit bileşiklerden olan MDA, membran komponentlerinin polimerizasyonu ve çapraz bağlanmasına neden olur. Bu durum ise iyon transportu, enzimatik aktivite, hücre yüzey determinantlarının agregasyon durumları ile intrinsek membran özelliklerini değiştirir. Bu nedenle LP'nun son ürünlerinden olan MDA tayini hücre hasarının derecesinin bir göstergesi olarak kabul edilir (5).

Kontrol grubuna göre tüm hasta gruplarımızda anlamlı olarak yüksek MDA düzeyleri tespit ettik. Bu da hasta gruplarımızda oksidatif stresin ve doku yıkımının varlığını düşündürmektedir. Çalışmamızda yüksek ALT ve AST değerlerine sahip olan akut hepatit B'li grupta diğer gruplara göre en yüksek MDA düzeylerini bulduk. Hepatosellüler hasarın en iyi serum göstergeleri ALT ve AST düzeyleridir. Yüksek ALT düzeyleri ile MDA arasında korelasyon bulamadık fakat yüksek AST düzeyleri ile MDA arasında anlamlı bir korelasyon saptadık. ALT sadece hücre sitoplazmasında bulunurken AST hem stiplazmada hem de mitokondride yerleşmiştir. Bu nedenle AST'nin oksidatif olaylara daha duyarlı olduğu düşünülmektedir.

Akut hepatit B'li grupta oluşan yüksek MDA'nın kaynağı sadece hücre membrandlarındaki PUFA'nın peroksidasyonu değil aynı zamanda virüslerle aktive olan fagositler tarafından salınan prooksidan sitokinler (TNF, IL-1) ve bilinmeyen başka mekanizmalar olabilir. Akut hepatitler inflamatuvar bir cevapla seyreder ve serbest oksijen radikalleri inflamasyon sırasında üretilir. Fagositlerin aktivasyonu, O₂ tüketiminin hızındaki artışla karakterizedir bu yüzden de 'respiratory burst' (solunumsal patlama) diye adlandırılır (6). Akut viral hepatitlerde yüksek viral replikasyon, yüksek inflamatuvar yanıt serbest radikallerin daha çok oluşumuna yol açabilir.

Kontrol grubuyla, sayıları az olmakla birlikte kronik HBV ve kronik HCV'li grubun MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir. Kronik viral hepatitlerde artan serbest oksijen radikallerinin üretiminden değişik mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır. Bunlardan biri karaciğerin prooksidan düşük molekül ağırlıklı demir kompartımanının artmasıdır. Demir Fenton reaksiyonu ile süperoksit ve H₂O₂ varlığında OH radikali oluşumunu katalizler. HBV ve HCV'ye bağlı karaciğer hastalığında demir metabolizmasının düzenlenmesinin bozulduğu saptanmıştır (7-8).

Serbest oksijen radikalleri üretiminden sorumlu diğer bir mekanizmada karaciğeri infiltre eden mononükleer hücre ve Kupffer hücrelerinin aktivasyonudur. Bu hücrelerin her ikisi de oksijen radikallerini üretebilir (9).

HBV ve HCV'nin bizzat kendilerinin direkt oksijen radikalleri üretimine etkisi konusunda literatür taramasında bir yayın bulunamamıştır. Bu konuda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Karaciğerin kronik patolojisinin onun sirkülasyon ve oksijenizasyonunda bozukluğa neden olduğu, böylece LP oluşturduğu, sonuç olarak MDA konsantrasyonunu artırdığı şeklinde bir hipotez de düşünülebilir (10). Hepatosit harabiyetindeki mekanizma PUFA'dan zengin mitokondriyal ve mikrozmal membranlardaki LP ile başlar, MDA ve diğer sitotoksik aldehytlerin sentezindeki artışla devam eder. Bu ürünlerin protein tiyol ve amino gruplarıyla reaksiyona girmesi sonucu ilerleyici hepatosit nekrozu ve inflamatuvar olayda antiproteazların inhibisyonu, lanet prokollagenaz aktivasyonu ve arşidonik asit döngü aktivasyonu gibi hücre fonksiyon değişiklikleriyle sonuçlanır (11).

Romero ve arkadaşları kronik HCV'li hastalarda oksidatif stresin rolünü araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada karaciğerin histopatolojik bulgusunun derecesinin ALT aktivitesinden çok MDA konsantrasyonları ile korele olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak kronik HCV'li hastaların klinik olarak değerlendirilmesinde MDA ölçümünün ek bilgi vereceğini ileri sürmüşlerdir (12).

Çalışmamızda MDA düzeyleri akut viral hepatitli grupta, kronik hepatitli gruptan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Akut viral hepatitte yüksek viral replikasyon artmış inflamasyona bağlı olabilir. Kronik olanlarda bu süreç daha yavaş olarak ilerlemektedir. Çalışmada sayıları az olmakla birlikte kronik hepatit B ve C infeksiyonlu gruplarda MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Her iki viral infeksiyonda da kronik olgularda benzer mekanizmalar rol oynuyor olabilir.

Serbest radikaller organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında da oluşur.

Organizmada çeşitli yollarla oluşan serbest oksijen radikallerine karşı oksidatif hasarı önleyen, sınırlayan ya da kısmen tamir eden antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır. Sağlıklı bireylerde oluşan serbest oksijen radikalleri ile antioksidan savunma sistemi dengededir. Serbest oksijen radikallerinden yana bir dengesizlik durumunda ya antioksidan savunma zayıflamıştır ya serbest oksijen radikallerinin üretimi artmıştır ya da her iki etki bir arada görülür.

Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarının total antioksidan düzeylerini ölçmek amacıyla serumlar oksidasyona uğratılmış ve sonunda lipid peroksidasyon düzeylerinin ölçümü yapılmıştır. Böylece hastalarda lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşma miktarı ile lipid peroksidasyonuna direnç

arasındaki negatif korelasyondan yola çıkarak hastalardaki total antioksidan durum hakkında yorum yapmak amaçlanmıştır.

Buna göre akut viral hepatit B'li hastaların diğer gruplara göre anlamlı olarak oksidasyona direnci düşük bulunmuştur. Akut hepatit B grubunda bulduğumuz total antioksidan aktivitede anlamlı azalma doku hasarıyla oluşan serbest radikallerden yana antioksidan savunma sisteminin dengesindeki bozulmayı ortaya koyar.

Oksidasyona direncin düşük olması organizmanın enzimatik ve/veya nonenzimatik antioksidan kapasitesinin düşük olduğunun göstergesidir. Bu durumun muhtemel sebepleri arasında bu gruptaki hastaların kontrol ve diğer gruplara göre nonenzimatik savunma sistemindeki önemli faktörlerden ve esansiyel olarak diyetle anılması gereken antioksidan vitaminlerin daha az oranda alınması ve/veya akut dönemde organizmanın adaptasyon için yeterli mekanizmaları üretememesi veya üretilen elemanların hızla kullanılması olabilir.

Virüsler, konakçı hücre prooksidan ve antioksidan dengesini hücre sel prooksidanları (demir, nitrik oksit gibi) artırarak değiştirebilir ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin sentezini de inhibe edebilirler (13-14). Akut viral hepatitlerde hızlı viral replikasyon belki de antioksidan enzimlerin sentezini inhibe etmektedir. Bu konuda da yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmüştür.

Kronik HBV ve HCV'li grubun oksidasyona dirençlerini kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda anlamlı bir fark bulamadık. Kronik karaciğer hastalıklarında sürekli bir inflamatuvar yanıt ve hücre harabiyeti vardır. Bunlar sonucunda artan oksidatif stresle başa çıkmak için de vücut antioksidan sistemlerini daha çok kullanmaya başlamış olabilir veya antioksidan sistemde, akut viral hepatitlerden farklı olarak başka mekanizmalar rol oynayabilir.

Sonuç olarak, bir ön çalışma olarak değerlendirilebilecek bu çalışmada serbest oksijen radikalleri ve antioksidan sistemin viral hepatit patogenezinde yer aldığı söylenebilir. Bunun bir neden sonuç ilişkisi olduğu bilinmemektedir. Bu konuda yapılacak geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu gösterilmiştir. Bu konuda yapılacak çalışmalar belki gelecekte kronik hepatit tedavisinde antioksidan tedaviyi gündeme getirecektir.

KAYNAKLAR

1. Britton RS, Bacon BR., Role of Free Radicals in Liver Diseases and Hepatic Fibrosis. *Hepato-Gastroenterology* 1994; 41: 343-348.
2. Uysal M., Serbest Radikaller, Lipid Peroksidleri ve Organizmada Prooksidan-Antioksidan Dengeyi Etkileyen Koşullar. *Klinik Gelişim* 1998; 11 (1-2): 336-341.
3. Hunter MIS, Nlemadim BC, Davidson DLW., Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Neurochemical Research* 1985; 10 (12): 1645-1652.
4. Agil A, Fuller CJ, Ishwarla J., Susceptibility of plasma to ferrous iron, hydrogen peroxide mediated oxidation: Demonstration of a possible fenton reaction. *Clinical Chemistry* 1995; 41: 220-225.
5. Cross C., Halliwell B., Borris E., Prior W., Oxygen radicals and human disease. *Annual International Medicine* 1987; 107: 526-545.
6. Samuni A, Krishna C, Cook J, Black JDW., On radical production by PMA-stimulated neutrophils as monitored by luminal-amplified chemiluminescence. *Free Radical Biology and Medicine* 1991; 10: 305-313.
7. Higuera V, Raya A, Rodrigo JM, Serra MA, Roma J, Romero FJ., Interferon decreases serum lipid peroxidation products of hepatitis C patients. *Free Radical Biology and Medicine* 1994; 16: 131-134.
8. Di Bisceglie AM, Axtoris CA, Hoofnagle JH, sBacon BR., Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 102: 2108-2113.
9. Yu BP., Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiological Review*. 1991; 74: 139-162.

10. Babior BM, The respiratory burst of phagocytes. *Journal of Clinical Investigation* 1984; 3: 599-601.
11. Socha P, Rujner J, Socha J., The role of oxygen radicals and their oxidants in pathogenesis of chronic hepatitis. *Ped. Pol* 1992; (suppl. 1-2): 139-144.
12. Romero MJ, Bosch-Morell F, Romero B, Rodrigo JM, Serra MA, Romero FJ., Serum malondialdehyde: Possible use for clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radical Biology and Medicine* 1998; 25 (9): 993-997.
13. Schwarz KB., Oksidatif stress during viral infection: A review. *Free Radical Biology and Medicine* 1996; 21 (5): 641-649.
14. Mutlu-Türkoğlu Ü, Ademoğlu E, Türkoğlu S, Badur S, Uysal M, Toker G., The effects of interferon- α serum lipid preoxidation and total thiol content in patients with chronic active hepatitis-C. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 1997; 96 (3): 357-361.