

Behçet Hastalığında Artmış Plazma Nitrit ve Nitrat Düzeyleri

INCREASED PLASMA LEVELS OF NITRITE AND NITRATE IN BEHÇET'S DISEASE

Turna İLKNUR¹, Şebnem ÖZKAN¹, Güldal KIRKALI², Emel FETİL¹, Semra KOÇTÜRK², Zeynep TOKGÖZ², Ali Tahsin GÜNEŞ¹

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Behçet hastalığı, immün kompleksler ve vaskulit bulguları belirlenen, multisistemik kronik inflammatif bir hastalıktır. Son yapılan çalışmalar patogenezi mikrobiyal antijenler, T hücre aktivasyonu, monosit ve makrofajlar ile artmış sitokin üretiminin olası rolünü işaret etmektedir. Bazı sitokinlerin nitrik oksid sentezine neden olabildiği ve nitrik oksidin inflammatif hastalıklardaki önemli rolü bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı nitrik oksidin (NO) Behçet hastalığı patogenezi rolü olup olmadığını saptamaktır.

Gereç ve yöntem: Nitrik oksid parçalanma ürünleri olan nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) plazma düzeyleri 42 semptomlu Behçet hastası, 29 semptomsuz Behçet hastası ve 60 sağlıklı kontrolden alınan örneklerde araştırıldı.

Bulgular: Semptomlu hastalardan alınan plazma örneklerinde nitrat ve nitratın toplam düzeyleri, semptomsuz hastalarla ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseklik gösterdi ($p < 0,001$). Aynı şekilde, semptomsuz Behçet hastaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nitrat ve nitrat toplam düzeyleri istatistiksel olarak yüksek saptandı ($p < 0,001$).

Sonuç: Mikrobiyal ajanlar sayırlığı ve sitokin üretimini provoke ederek nitrik oksid sentezine yol açabileceğinden dolayı, NO metabolitlerindeki yükselme bulgusu Behçet hastalığı patogenezi nitrik oksidin rolü için indirekt bir delil teşkil edebilir.

Anahtar sözcükler: Behçet hastalığı, nitrit, nitrat, nitrik oksid

SUMMARY

Objective: Behçet's disease is a chronic, multisystemic inflammatory disorder in which immune complexes and vasculitis are found. Recent studies point out a probable role of microbial antigens, activation of T cells, monocytes and macrophages and increased production of cytokines in the pathogenesis. It is known that some cytokines may cause nitric oxide synthesis and nitric oxide plays an important role in inflammatory diseases. The aim of this study was to determine whether or not nitric oxide (NO) is involved in the pathogenesis of Behçet's disease.

Material and method: The plasma levels of nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-), the breakdown products of nitric oxide, were investigated in the samples obtained from 42 Behçet's patients with symptoms, 29 Behçet's patients without symptoms and 60 healthy controls.

Results: The plasma samples obtained from patients with symptoms showed statistically significant high levels of nitrate plus nitrite compared to patients without symptoms ($p < 0.001$) and compared to the control group ($p < 0.001$). Also, statistically significant high levels of nitrate plus nitrite were detected in Behçet's patients without symptoms compared to the control group ($p < 0.001$).

Conclusion: Because of microbial agents that can provoke the disease and cytokine

Turna İLKNUR

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Dermatoloji Anabilim Dalı

İnciraltı, 35340, İZMİR

Tel: 232- 4123856

Fax: 232. 2771217

e-posta: turna.ilknur@deu.edu.tr

production can cause the nitric oxide synthesis, the finding of elevated serum NO metabolites might be an indirect evidence for the role of NO in the pathogenesis of Behçet's disease.

Key words: Behçet's disease, nitrite, nitrate, nitric oxide

İlk kez 1937 yılında bir Türk hekim olan Hulusi Behçet tarafından tanımlanan Behçet sayırlığı (1), oral aftlar, genital ulserasyonlar, uveit, eroziv olmayan artrit, santral sinir sistemi tutulumu ve değişik kutan lezyonlarla karakterize multisistemik kronik inflamatif bir sayırlıktır (1,2). Tüm çaplardaki damarları tutan bir vaskulit tablosu içeren bu sayırlığın bazı özellikleri immun kompleks sayırlıkları ile ortaktır (3,4). Etiyolojisi kesin olmasa da, immun fonksiyon ve yanıtta değişikliklere yol açabilen bazı mikrobiyal antijenlerin rolü olabileceği düşünülmektedir (5,6). Behçet sayırlığı olan hastalarda bakteriyel antijenler T hücreleri, makrofaj veya monositleri aktive edebilir ve aktive olmuş hücreler tumor nekroz faktör-alfa, IL₁, IL₆ ve IL₈ gibi proinflamatif ve/veya inflamatif sitokinleri oluşturabilir (7-10).

Diğer taraftan, sitokinlerin nitrik oksid sentaz aracılığıyla L-argininden nitrik oksid sentezine neden olabildiği bilinmektedir (11). Son zamanlarda sistemik vaskulitlerde nitrik oksidin yoğun olarak oluşturulduğu ileri sürülmüştür (12). Bu açıdan bakıldığında, Behçet sayırlığında aşırı bir nitrik oksid üretimi beklenebilir.

Gaz durumunda ve çok kısa yarı ömürlü olarak bulunması nedeniyle nitrik oksidin ölçülmesi zordur. Bununla birlikte, nitrik oksid üretiminin belirteci olarak kullanılabilen nitrik oksidin son oksidasyon ürünleri olan nitrit ve nitrat biyolojik sıvılarda kolaylıkla ölçülebilir (13-15). Bu çalışmada semptomlu veya semptomuz Behçet hastalarından elde edilen plazma nitrit ve nitrat düzeylerinin saptanması ile, nitrik oksid ve Behçet sayırlığı arasındaki bağlantı araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar

Bu çalışmaya 42 semptomlu Behçet sayırlıklı olgu, 29 semptomuz Behçet sayırlıklı olgu ve kontrol grubu olarak da 60 sağlıklı olgu alınmıştır. Semptomlu Behçet sayırlıklı olguların (22 kadın, 20 erkek) ortalama yaşı

38,5 (20-58) olup, sayırlık süreleri 1 ay ile 21 yıl arasında değişmekteydi. Semptomuz Behçet sayırlıklı olguların (15 kadın, 14 erkek) ortalama yaşı 38,4 (24-55) olup, sayırlık süreleri 8 ay ile 20 yıl arasında değişmekteydi. Kontrol grubundaki olguların ortalama yaşı 37 (25-50) idi. Behçet olgularında tanı Uluslararası Çalışma Grubu tarafından tanımlanan klinik kriterlere göre konulmuştu (16). Semptomlu Behçet sayırlığı olguları, bu kriterlere göre belirlenen klinik bulgulardan en az birine sahip olgulardı. Çalışmaya dahil edilen olgulardan hiç biri çalışmaya dahil edilmeden 1 ay öncesine kadar herhangi bir sağaltım almamışlardı.

Örnekler

Olguların tümünden yazılı onam alınmış olup, çalışma için örneklerin alındığı gün tüm olguların dinlenmiş ve yemek yememiş olmalarına dikkat edilmiştir. Olgulardan rutin hematolojik inceleme için alınan kan örnekleri, sabah saat 8'de asid ile yıkanmış tüplerde toplanmıştır. Koagülasyonu takiben tüm örnekler 10 dakika boyunca 4000 g'de santrifüje edilmiş ve serumlar incelemeye kadar -70°C'de biriktirilmiştir (14).

Nitrit saptanması

NO₂ konsantrasyonu daha önce tanımlanan Griess reaksiyonu ile saptanmıştır (17). Tüm örnekler distile su ile 4 kat olacak şekilde sulandırılmış ve son konsantrasyonu 15 g/l olacak şekilde 1/20 hacminde çinko sulfat (300 g/l) eklenerek deproteinize edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 9500 g'de santrifüj sonrasında "150 mikrolitrelik supernatant temiz bir tübe uygulanmış ve 450 mikrolitrelik Griess ayracı (1 N HCl içinde %1 sulfonilamid, %15 N-1 naftiletilediamin diklorid) eklenmiştir. İyi karışmasından sonra bütün tüpler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlık bir yerde bekletilmiştir. Reaksiyon zamanının sonunda absorbanlar 550 nm dalga boylu spektrofotometre (Jasco-500/Japonya) ile ölçülmüştür. Kontrol yine aynı yolla hazırlanmış, fakat serum yerine 150 mikrolitrelik potasyum fosfat tamponu kullanılmıştır. Her bir örnek kopyalanarak analiz edilmiş ve nitrit

konsantrasyonu 0-100 mikromol/litre konsantrasyon aralığında sodyum nitrit ile hazırlanmış standart eğriden saptanmıştır.

Nitrat saptanması

Nitrat da nitrite benzer şekilde, Moshage ve ark. tarafından tanımlandığı gibi *Aspergillus spp*'den (Sigma/ABD) nitrat reduktaz (EC 1.6.6.2) yoluyla enzimatik dönüşüm sonrasında ölçülmüştür (15). Bu prosedür tüm nitratların nitrite indirgenmesi ve nitrit konsantrasyonunun toplamının ölçülmesine dayalı olup, nitrat konsantrasyonu total nitrit konsantrasyonundan ölçülen nitrit değerinin çıkarılması ile hesaplanmıştır. 40 mikrolitre nitrat reduktaz (20 mU), 50 mikrolitre FAD (5 mM), 10 mikrolitre NADPH (0.6 mM) ve 250 mikrolitre fosfat tampon (50 mM), analiz öncesinde 1/5 çinko sulfat solusyonu ile karıştırılarak hazırlanmış olan 100 mikrolitrelik deproteinize örnekler eklenmiştir. Bu karışımlar 37°C'de 1 saat boyunca inkube edilmiş, sonra karışımın 150 mikrolitresi 450 Griess ayıracağına eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca tekrar inkube edilmiştir. Absorbanlar 550 nm dalga boylu spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Testin kontrolü 5 sağlıklı olgunun serum havuzuna bir iç standart basım metodu kullanılarak ölçülmüş olup deproteinizasyondan sonra serumdaki nitritin kontrolü %85-109 (ortalama %93; n=5) olarak hesaplanmıştır.

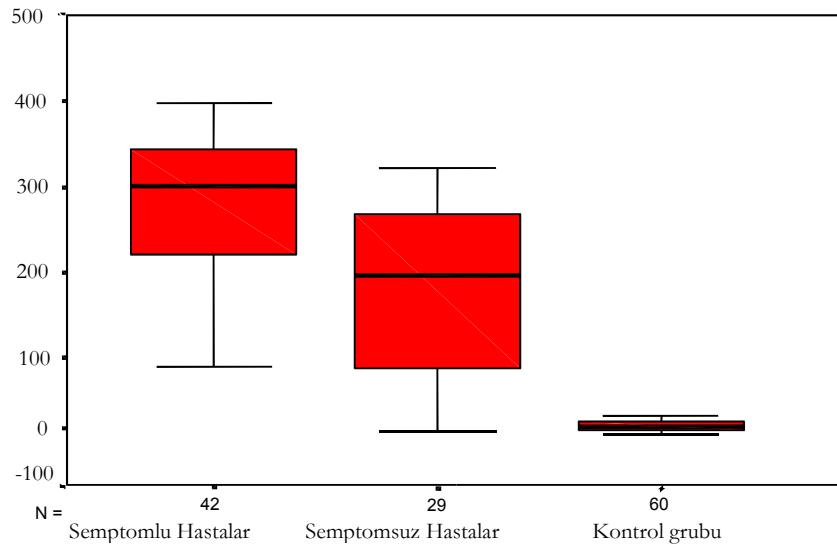
İstatistiksel analiz

Bu 3 grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi ve iki bağımsız grubun karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Tüm değerler ortalama ve çeyrek arası aralık olarak bildirilmiş ve 0,05'ten küçük olan 'p değeri' istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Simptomlu olgularda ortalama plazma nitrit + nitrat düzeyleri 300,0 mikromol/litre (çeyrek arası aralık: 212,7-344,0) olarak, semptomsuz olgularda ortalama plazma nitrit + nitrat düzeyleri 196,5 mikromol/litre (çeyrek arası aralık: 87,4-272,5) olarak ve kontrol grubundaki olgularda ortalama plazma nitrit + nitrat düzeyleri 20,6 mikromol/litre (çeyrek arası aralık: 15,3-26,1) olarak saptanmıştır. Verilerimiz Şekil 1'de gösterilmiştir.

Plazma nitrit + nitrat düzeyleri karşılaştırıldığında, üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,001$). Simptomlu olgulardan alınan plazma örneklerindeki nitrit + nitrat düzeyleri semptomsuz olgular ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak saptanmıştır ($p<0,001$). Ayrıca semptomsuz olgulardan alınan plazma örneklerinde de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek nitrit + nitrat düzeyleri saptanmıştır ($p<0,001$).



Nitrat+
nitrit
(µmol/L)

HASTALAR

TARTIŞMA

Şekil 1. Simptomlu hastalar, simptomsuz hastalar ve kontrol grubunda ki plazma nitrat + nitrit düzeylerini gösteren kutu grafik

Nitrik oksid, nitrik oksid sentaz (NOS) etkisi ile L-argininden sentez edilen fizyolojik haberci bir moleküldür. NOS hemen her dokuda farklı düzeylerde bulunmaktadır (18). nNOS (nöronal doku), eNOS (vasküler endotel hücreler) ve iNOS (makrofajlar) olmak üzere 3 izoformu vardır. iNOS esansiyel olarak makrofajlarda ekspresyon edilmeyle birlikte, vasküler endotel hücreler, hepatositler ve düz kas hücrelerinde de bulunmaktadır (1,13,18). iNOS genellikle bu hücrelerin bakteriyel ürünler ve interferon γ ve IL_1 gibi sitokinlere maruziyetini takiben aktive olması ile ekspresyon olmaktadır. Bu maddenin inflammatif yanıt, nörotransmisyonlar, nörotoksitesite, serebral kan akımı regülasyonu, vazodilatasyon, trombosit agregasyonu inhibisyonu ve sitokinlerin antiproliferatif etkisi üzerine önemli biyolojik rolleri olduğu bildirilmiştir (11,13). Aynı zamanda nitrik oksidin sistemik vaskülitte yoğun olarak üretildiği ve immün kompleks oluşturduğu vasküler hasardan sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (12,19). Bir çalışmada romatoid artritli hastaların serumunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek nitrit düzeyleri gösterilmiştir (20).

Behçet sayrılığının patogeneğinde, dolaşan immün kompleks aracılı hasar ve artmış nötrofil migrasyonunun etkili olduğu düşünülmektedir. Histopatolojik özellikler vaskülit ile karakterize (21) olup, vaskülopati tüm çaplardaki kan damarlarını tutmaktadır (4). Orem ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Behçet sayrılığının aktif döneminde inaktif dönem ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük plazma nitrit, nitrat ve nitrit+nitrat düzeyleri saptanmıştır. Ayrıca inaktif periyod ve kontrol grubu arasında plazma nitrit ve nitrat düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı da saptanmıştır. Yazarlar Behçet sayrılığında saptadıkları azalmış NO üretiminin nedeninin Behçet sayrılığındaki endotelial disfonksiyonun bir sonucu olabileceğini düşünmüşlerdir (22). Evreklioğlu ve ark, aktif periyoddaki Behçet sayrılığında serum nitrit düzeylerinin inaktif periyod ve sağlıklı kontrollere göre

daha yüksek olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca inaktif Behçet sayrılığında ki plazma nitrat + nitrit düzeylerini gösteren kutu grafik

Behçet sayrılığında ki plazma nitrat + nitrit düzeylerinin sağlıklı kontrollerden anlamlı oranda daha yüksek olduğunu saptamışlardır (23). Sancak ve ark. aktif periyoddaki Behçet sayrılığında ki plazma nitrit+nitrat düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (24). Koçak ve ark. ise, aktif periyodda Behçet sayrılığında ki plazma nitrat düzeylerinin, sağaltım görmüş Behçet sayrılığında ki plazma nitrit+nitrat düzeylerinin, sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (25). Bizim çalışmamızda da, simptomlu olgulardan alınan plazma nitrit+nitrat düzeyleri simptomsuz olgulara ve kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bizim sonuçlarımız Evreklioğlu ve ark, Sancak ve ark. ile Koçak ve ark.rıninkine benzemekle birlikte, Orem ve ark. rınkinden farklıdır. Behçet sayrılığında ki plazma nitrit oksid düzeylerinin sebebinin diğer sistemik vaskülitler ile benzer olabilmesi muhtemeldir. Bir diğer taraftan, simptomlu olgulardan elde edilen serum örnekleri simptomsuz olgularla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek nitrit+nitrat düzeyleri gösterilmiştir. Artmış serum nitrik oksid metabolit bulguları, dolaylı bir kanıt olmakla birlikte, Behçet sayrılığında ki plazma nitrit oksid düzeylerinin evrelerinde nitrik oksidin rolü ile ilgili soruları arttırmıştır.

Behçet sayrılığının etyopatogeneğinde genetik bir eğilim ve HLA-B1 ile anlamlı birliktelik yanında, immün fonksiyon ve yanıtta değişikliklere yol açan bazı uyarıcı ajanlar ileri sürülmüştür. Son zamanlarda, in-feksiyonlar (herpes simpleks virus ve *streptokok spp.* gibi) ve Behçet sayrılığında ki plazma nitrit oksid düzeyleri arasındaki ilişki yoğun bir şekilde araştırılmıştır (5,21). Streptokokkal antijenlere maruziyet bazı araştırmacılar tarafından provokan faktörlerden biri olarak suçlanmıştır (6). Sakane Behçet sayrılığında insan ısı şok proteini (HSP)-60'ın spesifik bir peptidine yanıt olarak T hücre proliferasyonunu gözlemiş, ancak normal olgularda ve romatoid artritli olgularda bu duruma rastlamamıştır (7). Benzer olarak, diğer çalışmalar da ısı şok proteininin gama delta ve alfa beta T hücrelerinin aktivasyonu için tetikleyici faktörlerden biri olabileceği düşüncesini desteklemek-

tedir. Böylece, T hücrelerini aktive eden bakteriyel antijenlerin sayırlığı oluşturabileceği ve/veya şiddetlendirebileceği ileri sürülmüştür. Aktive olmuş T hücreleri proinflamatif ve/veya inflamatif sitokinler ile makrofaj ve nötrofillerde aktivasyon oluşturabilirler (8). Ayrıca monositlerin *in vivo* aktif olduğu ve bazı sitokinler oluşturduğu da ileri sürülmüştür (9). Mege ve ark. monositler tarafından TNF-alfa, IL₆ ve IL₈'in sekresyonunun aktif sayırlıklı olgularda artmış olduğunu, LPS (lipopolisakkarid) ile uyarılmış TNF-alfa, IL₁, IL₆ ve IL₈ üretiminin ise sayırlık aktivitesiyle korelasyon göstermeksizin hastalarda artmış olduğunu bildirmişlerdir (10). Memişoğlu ve ark. da yaptıkları çalışmada anlamlı derecede yüksek IL₁ düzeyleri saptamışlardır (26).

Sonuçta, mikrobiyal ajanlar sayırlığı ve sitokin üretimini provoke edebileceğinden nitrik oksid sentezine yol açabilirler ve nitrik oksid metabolitlerindeki yükselme bulgusu Behçet hastalığı patogenezinde nitrik oksidin rolü için indirekt bir delil teşkil edebilir.

KAYNAKLAR

1. Behçet H. Über rezidivierende Aphthosen, durch ein Virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge und an den Genitalien. *Dermatol Wochenschr* 1937;105:1152-1157.
2. Jorizzo JL. Behçet's disease---an update based on the International Conference held in Paris, France. June 30 July 1. 1993. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1994; 3:215-223.
3. Scully C. The oral cavity. In: Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM, editors. *Textbook of dermatology*. 6. baskı. Oxford: Blackwell Science; 1998; 3072.
4. Golden BD, Goel A, Mitnick HJ. Behçet-type vasculopathy in a patient without the diagnostic features of Behçet's disease. *Arthritis Rheum* 1996;39:1926-1930.
5. Allen NB. Miscellaneous vasculitic syndromes including Behçet's disease and central nervous system vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 1993;5:51-56.
6. Calgüneri M, Kiraz S, Ertenli I, Benekli M, Karaaslan Y, Çelik I. The effect of prophylactic penicillin treatment on the course of arthritis episodes in patients with Behçet's disease. A randomized clinical trial. *Arthritis Rheum* 1996;39:2062-2065.
7. Sakane T. New perspective on Behçet's disease. *Int Rev Immunol* 1997;14: 89-96.
8. Yamashita N. Hyperreactivity of neutrophils and abnormal T cell homeostasis: a new insight for pathogenesis of Behçet's disease. *Int Rev Immunol* 1997; 14:11-19.
9. Şahin S, Lawrence R, Direskeneli H, Hamuryudan V, Yazıcı H, Akoğlu T. Monocyte activity in Behçet's disease. *Br J Rheumatol* 1996;35:424-429.
10. Mege JL, Dilşen N, Sanguedolce V, ve ark. Over production of monocyte derived tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL) 6, IL8 and increased neutrophil superoxide generation in Behçet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *J Rheumatol* 1993;20:1544-1549.
11. Bredt DS, Synder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994;63:175-195.
12. Bruce IN, Harris CM, Nugent A, McDermott BJ, Johnston GD, Bell AL. Enhanced endothelium-dependent vasodilator responses in patients with systemic vasculitis. *Scand J Rheumatol* 1997;26:318-324.
13. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-134.
14. Borjes PN, Borjes C. Nitrate determination in biological fluids by enzymatic one step assay with nitrate reductase. *Clin Chem* 1995;41:904-907.
15. Moshage H, Kok B, Huizenge JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41:892-896.
16. International Study Group of Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 1990; 335: 1078-1080.
17. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-138.
18. Knowles R. Nitric oxide synthases. *The Biochemist* 1994;3-6.
19. Mulligan MS, Moncada S, Ward PA. Protective effects

- of inhibitors of nitric oxide synthase in immune complex-induced vasculitis. *Br J Pharmacol* 1992; 107: 1159-1162.
20. O'Donnell C, Liew E. Immunological aspects of nitric oxide. *The Biochemist* 1994;19-22.
 21. Ghate JV, Jorizzo JL. Behçet's disease and complex aphthosis. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:1-8.
 22. Orem A, Vanizor B, Cimsit G, Kiran E, Deger O, Malkoc M. Decreased nitric oxide production in patients with Behçet's disease. *Dermatology* 1999; 198: 33-36.
 23. Evereklioglu C, Turkoz Y, Er H, Inaloz HS, Ozbek E, Cekmen M. Increased nitric oxide production in patients with Behçet's disease: is it a new activity marker? *J Am Acad Dermatol*, 2002;46:50-54.
 24. Sancak B, Önder M, Öztaş MO, Bukan N, Gürer MA. Nitric oxide levels in Behçet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003;17:7-9.
 25. Koçak M, Erbaş D, Karabulut AA, Öztürk G, Ekşioğlu M. Behçet's disease and nitric oxide production. *Int J Dermatol* 2003;42:244-245.
 26. Memişoğlu H, Aksu HZS, Erken E, Gökük M. Serum interleukin-1 levels in Behçet's disease. In: O'Duffy JD, Kokmen E, editors. *Behçet's disease: basic and clinical concepts*. New York: Marcel Dekker; 1991; 387-391.