بررسی تغییرات حجم و بافت مزانژیال کلافه‌های گلومرولی در رتهای دیابتی شده توسط آلوکسان به روش کمی

محسن پورقاسم Ph.D.☆♦، ناهید امینیان M.D.★، مرتضی بهنام‌رسولی Ph.D.★، محمدرضا نیکروش Ph.D.★، مهدی جلالی Ph.D.★

☆ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه پاتولوژی

★ دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦آدرس مکاتبه: بابل، کدپستی ۴۷۱۷۶، دانشگاه علوم پزشکی بابل، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** تشخیص زودرس تغییرات کلافه‌های گلومرولی در بیماری دیابت

* **مواد و روشها:** از آنجایی که نفروپاتی دیابتی در رتها بسیار مشابه انسان است، بنابراین در این تحقیق تغییرات کلافه‌های گلومرولی در دو دورهٔ دیابتی ۸ و ۱۷ هفته‌ای در رتهای دیابتی شده توسط آلوکسان بررسی شدند. برای این بررسی از رنگ‌آمیزیهای H&E، PAS جهت تعیین حجم و بافت مزانژیال و روش استریولوژی جهت تعیین حجم کلافه گلومرولی استفاده شده است.

* **یافته‌ها:** بررسیها نشان داده است که در دوره دیابتی ۱۷ هفته‌ای بافت مزانژیال و حجم کلافه‌ها $P<0.05$ افزایش معنی داری یافته است ولی برای دوره ۸ هفته‌ای معنی‌دار نبود.

* **نتیجه‌گیری:** این تحقیق نشان داده است که در دوره دیابتی کوتاه مدت نیز می‌توان درگیری کلافه‌ها را نشان داد که می‌تواند هشداری برای اتخاذ تدابیر درمانی مناسب در جلوگیری از پیشرفت آسیب کلیوی باشد.

* **کل واژگان:** کلیه، دیابت ملیتوس، آلوکسان، گلومرول

مقدمه

یکی از اندامهایی که در بیماری دیابت دچار آسیب می‌شود کلیه است و علت دیالیزی شدن درصد بالایی از افراد دیابت می‌باشد. مهمترین عارضه دیابت بر روی کلیه آسیب کلافه‌های گلومرولی است که تشخیص زودتر این درگیری می‌تواند راندمان درمانی بهتری را در پی داشته باشد.

دیابت قندی ملیتوس یک بیماری متابولیکی است که شامل اختلال در متابولیسم کربوهیدراتها و کاهش مصرف گلوکز است که منجر به افزایش قند خون می‌شود و این ناشی از فقدان یاکاهش ترشح انسولین و یا عمل غیر موثر آن است (۱)؛ و نه تنها در متابولیسم کربوهیدراتها ایجاد اختلال می‌کند بلکه متابولیسم چربیها و پروتئینها را نیز مختل می‌نماید (۲). در هر دو گروه دیابت I (وابسته به انسولین) و تیپ II (غیر وابسته به انسولین) می‌توان آسیب کلیوی را مشاهده کرد که در نهایت باعث نفروپاتی می‌شود که یکی از مهمترین علل بیماری نهایی کلیه است و نیاز به دیالیز را به دنبال دارد (۳، ۴). مهمترین عارضه نفروپاتی گلومرولواسکروزیس است که به صورت منتشر یا ندولار خود را نشان می‌دهد که در نوع ندولار بخشهایی از مزانژیوم به صورت ندول ضخیم شده و در مطالعات بافت‌شناسی به صورت PAS مثبت در می‌آید ولی در نوع منتشر کل مزانژیوم کلافه گلومرولی ضخیم می‌شود (۵). گلومرولواسکلروزیس منتشر ناشی از دیابت معمولاً دیرتر خود را نشان می‌دهد و زمانی قابل تشخیص خواهد بود که بیمار دچار سندرم نفروتیک شده باشد، یعنی پروتئینوری، کاهش آلبومین خون و خیز وجود دارد و در یافته‌های آسیب‌شناسی افزایش ماتریکس مزانژیال و پرولیفراسیون همراه با افزایش ضخامت غشای پایه گلومرولی دیده می‌شود (۶). مطالعات مورفومتری نشان داده است که نفروپاتی بعد از افزایش ضخامت غشای پایه و ماتریکس مزانژیال پیش می‌آید (۷). علت اصلی آسیب گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی پروتئینهای پلاسما و غشای پایه کلافهای گلومرولی است (۸، ۹). زیرا در یک محیط هیپرگلیسیمیک گلوکز توسط پیوند کووالان با گروه آمین پروتئینها عکس‌العمل نشان می‌دهد که در ابتدا این گلیکوزیلاسیون قابل برگشت می‌باشد (۹). ولی در زمانی طولانی‌تر مولکولهایی مثل کلاژن پیوند غیر قابل برگشتی را با گلوکز تشکیل می‌دهد (۹). بنابراین تشخیص زودتر درگیری کلیه می‌تواند راندمان درمانی بهتری را در پی داشته باشد. از آنجا که پارامترهای تشخیصی در آسیب‌شناسی کلیه در دیابت معمولاً سالها بعد از شروع دیابت خود را نشان می‌دهد؛ بنابراین در این تحقیق سعی شده است که تغییرات اولیه زودرس‌تر کلافه‌ها توسط روشهای کمی بررسی شود. زیرا مطالعه تغییرات ساختمانی به صورت کمی باعث بالا رفتن دقت مطالعه شده و در آسیبهای کلیوی بسیار ضروری است (۱۰).

مواد و روشها

تعداد ۸۳ سر رت نر نژاد Whistar با وزن حدود ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از موسسه تحقیقاتی و سرم سازی رازی مشهد تهیه شد. رتها به طور تصادفی در سه گروه قرار داده شدند: گروه تجربی اول (n=۲۳)، گروه تجربی دوم (n=۳۰) و گروه شاهد (n=۳۰). گروه‌های تجربی با یک بار تزریق زیر جلدی با دوز ۱۲۰ mg/kg دیابتی شدند (۱۱). اثر استرس تزریق با تزریق سرم فیزیولوژیک در گروه شاهد ایجاد شد. هر سه گروه در شرایط یکسان و استاندارد از نظر رطوبت، درجه حرارت (۱+۲۳ سانتی‌گراد) و نور (۱۲ ساعت روشنائی و ۱۲ ساعت تاریکی که روشنایی از ساعت ۴ تا ساعت ۱۶) و دسترسی به مواد غذایی در حیوانخانه بیمارستان قائم (عج) مشهد نگهداری شدند. یک هفته بعد از تزریق آلوکسان قند خون آنها با دستگاه گلوکومتر از نوع Reftluxs و Typell-72115 اندازه گیری شد. قند خون بالای ۲۰۰ mg/dl ملاک بود. رتهایی که قند خون پایین‌تر از ۲۰۰ mg/dl داشتند از گروه حذف شدند. ۸ هفته بعد از تزریق، قند خون گروه تجربی اول دوباره اندازه گیری شد و رتهایی که قند پائین‌تر از ۲۰۰ mg/dl داشتند از گروه حذف شدند. چند سر رت دیابتی از این گروه در این مدت مردند که در نهایت ۱۵ سر رت از این گروه باقی ماندند که با توجه به این مسئله ۱۵ سر رت از گروه شاهد نیز به صورت تصادفی انتخاب شدند. رتهای گروههای تجربی و شاهد اولی با کلروفروم بیهوش شده و سپس با عمل پرفیوژن تثبیت کننده ۱۰درصد داخل قلب، عروق بزرگ و عروق کلیه وارد شد. سپس در هر رت کلیه راست را در آورده و به مدت ۴۸ ساعت در فرمالین ۱۰درصد برای انجام تثبیت بهتر قرار گرفت. بعد از آن کلیه‌ها به روش معمول بافت‌شناسی پاساژ داده شده و از آنها بلوک تهیه گردید. بلوکها به روش سریال به ضخامت ۵ میکرون برش داده شد و لامها توسط رنگ آمیزیهای H&E، PAS رنگ‌آمیزی گردید (۱۲). همین اعمال، ۱۷ هفته بعد از تزریق برای گروه تجربی دوم و شاهد باقی مانده انجام شد. تعداد رتهای باقی مانده در هر دو گروه تجربی دوم و شاهد ۱۵ سر بود. برای بررسی حجم کلافه‌های گلومرولی هر کلافه بر اساس نقاط رفرنس داخلی و خارجی از ابتدا تا انتها دنبال شد و سپس با روش شمارش نقطه‌ای کاوالیه حجم کلافه‌ها محاسبه شد (۱۰، ۱۲). به این صورت که تک تک تصاویر هر کلافه توسط میکروپروژکتور بر دیوار انداخته شد. حجم کلافه‌ها بر اساس میزان بزرگنمایی و فاصله نقاط استفاده شده با واحد میکرون مکعب محاسبه شد. برای هر رت ۶ کلافه در نظر گرفته شد. برای انداختن نقاط بر روی کلافه‌ها از کاغذ ترنسپرنس که نقاط روی آن با فاصله مساوی حک شده بود، استفاده شد. برای بررسی میزان بافت مزانژیال کلافه گلومرولی روش Steffes به کار رفت؛ بدین صورت که بر حسب شدت رنگ پذیری PAS که مشخصه بافت مزانژیال کلافه است نمره‌های ۱ تا ۴ داده شد (۱۳). برای درجه‌بندی شدت رنگ‌آمیزی و شمارش نقطه‌ای، لامها توسط دو نفر به صورت Blind مورد مطالعه قرار گرفت. پس از رتبه گذاری جداول مربوط برای هر پارامتر تهیه و پس از کدگذاری و وارد کردن اطلاعات به کامپیوتر، اطلاعات فوق توسط تست دو طرفه Mann-Withney برای تعیین میزان تاثیر یا عدم تاثیر بیماری دیابت بر روی حجم کلافه‌ها و میزان بافت مزانژیال آنها استفاده شد.

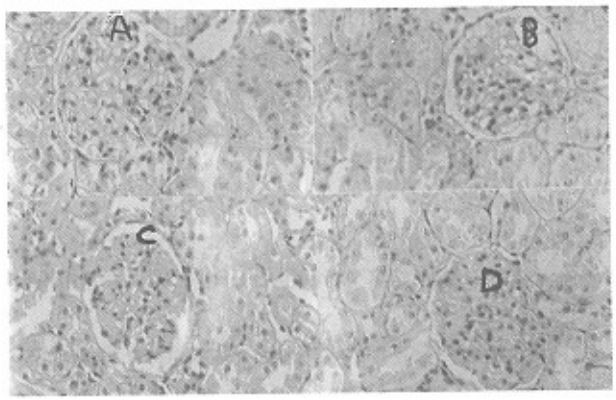
یافته‌ها

در گروه دیابت ۱۷ هفته‌ای بافت مزانژیال کلافه‌های گلومرولی

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار حجم و بافت مزانژیال کلافه‌ها در گروههای شاهد و تجربی

مدت دیابت	۸ هفته‌ای				۱۷ هفته‌ای			
گروه آزمایشی	تجربی		شاهد		تجربی		شاهد	
پارامترمورد نظر	حجم‌کلافه	بافت‌مزانژیال	حجم‌کلافه	بافت‌مزانژیال	حجم‌کلافه	بافت‌مزانژیال	حجم‌کلافه	بافت‌مزانژیال
X±SD	۰/۸۳×۱۰⁶ ± ۰/۰۶×۱۰⁶	۱/۵۱ ± ۰/۲۷	۰/۸۲۶×۱۰⁶ ± ۰/۰۶×۱۰⁶	۱/۲۷ ± ۰/۲۲	۱/۰۷×۱۰⁶ ± ۰/۰۸×۱۰⁶	۲/۳۵ ± ۰/۶۶	۰/۸۲۳×۱۰⁶ ± ۰/۰۶×۱۰⁶	۱/۴۲ ± ۰/۴۲

نسبت به گروه شد با جذب بیشتر رنگ مشخص شده است. به طوری که با اختلاف محسوس در میزان رنگ پذیری PAS طبق روش Steffes به صورت کمی قابل محاسبه بوده است ولی در گروه دیابتی ۸ هفته‌ای اختلاف محسوس دیده نشد (شکل و جدول ۱).



شکل ۱: میزان بافت مزانژیال بر اساس رتبه بندی Steffes از ۱- A تا ۴- D

A: رت شاهد و B، C، D: رت دیابتی ۱۷ هفته‌ای رنگ‌آمیزی: PAS. بزرگنمایی: x۱۰۰

افزایش حجم کلافه‌های گلومرولی در گروه تجربی ۱۷ هفته‌ای با $P<0.05$ معنی دار بوده ولی در گروه ۸ هفته‌ای معنی دار نبود؛ به عبارت دیگر افزایش حجم کلافه‌ها در گروه ۱۷ هفته‌ای وجود داشته در حالی که در گروه ۸ هفته‌ای وجود نداشته است (جدول ۱).

بحث

همان طوری که در این تحقیق دیده شد، کلیه یکی از اندامهای هدف در بیماری IDDM است. از آنجایی که کلیه‌ها نقش فیزیولوژیک مهمی در بدن دارند، درگیری آنها باعث عوارض سیستمیک وسیعی در بدن می‌شود. بنابراین توجه به عوارض دیابت بر کلیه امری مهم و حیاتی است؛ زیرا در بعضی از جوامع علت دیالیزی شدن حدود نیمی از افراد بیماری دیابت است (۶). همان طوری که از نتایج این تحقیق استنباط می‌شود اثرات IDDM بر کلیه با طول بیماری نسبت مستقیمی دارد و هر چقدر زمان بیشتری از شروع بیماری سپری شود عوارض کلیوی شدیدتر و وسیع‌تر خواهد بود. بنابراین تشخیص زودتر درگیری کلیه اهمیت فراوانی در جلوگیری از عوارض وسیع‌تر آن دارد. افزایش بافت مزانژیال کلافه گلومرولی که در این تحقیق دیده شده می‌تواند اولین علامت آسیب کلیه در بیماری دیابت باشد (۱۴). بافت مزانژیال همراه غشا پایه کلافه گلومرولی ماتریکس خارج سلولی (ECM)[1] کلافه‌ها را تشکیل می‌دهند که حاوی سلولهای مزانژیال و انواع کلاژن، فیبرونکتین، لامنین و پروتئوگلیکانها است. افزایش مزانژیال نتیجه افزایش سلولهای مزانژیال و اجزای دیگر ECM است. افزایش ECM به تدریج باعث بسته شدن بعضی از کاپیلرهای کلافه گلومری می‌شود و در نهایت تمام کاپیلرها را بسته و کلافه گلومرولی را از کار می‌اندازد. بنابراین حجم گلومرولهای باقیمانده افزایش می‌یابد تا بتوانند کار گلومرولهای آسیب دیده را جبران کنند (۱۰). افزایش نشت موادی مانند ایمونوگلوبولینهای نوع IgG، IgM اجزای کمپلمان مثل C۳ و فیبرین از عروق گلومرولی نه تنها می‌تواند باعث رسوب آنها شود بلکه سبب تحریک سنتز اجزای غشای پایه نیز می‌شود (۶). در این بررسی غشای پایه و بافت مزانژیوم در کلافه گلومرولی صورت نگرفت زیرا مرز بین آنها با میکروسکوپ نوری قابل تشخیص نبود، بنابراین افزایش ECM در این روش به دست آمده است. به صورت *in vitro* نشان شده‌اند که در محیط هیپرگلیسمیک سنتز اجزای غشای پایه کلاژن IV، فیبرونکتین و لامنین افزایش می‌یابد (۶، ۱۵، ۱۶). بنابراین افزایش ECM می‌تواند ناشی از افزایش سنتز اجزای تشکیل دهنده آن باشد. Walkiskava در سال ۱۹۹۴ نشان داد که هر سه سلول کلافه گلومرولی یعنی سلول مزانژیال، سلول آندوتلیوم کاپیرلهای گلومرولی) و سلول اپی‌تلیال (سلول پدوسیت در لایه احشایی کپسول بومن) می‌توانند باعث افزایش سنتز کلاژن IV در ECM شوند. وی همچنین اعتقاد دارد که افزایش ساخته شدن کلاژن در غشای پایه ماتریکس مزانژیال یک مشخصه مهم دیابت محسوب می‌شود (۱۶). نقش مزانژیوم در پیشرفت آسیب کلیوی در بیماری دیابت بسیار مهم و قابل توجه است (۱۶) افزایش ECM خود می‌تواند باعث افزایش حجم کلافه‌های گلومرولی شود. در این تحقیق این افزایش حجم با روش استریولوژی در رتهای دیابتی ۱۷ هفته‌ای نشان داده شده است که ظاهراً می‌تواند ناشی از افزایش بافت مزانژیوم باشد؛ زیرا مدت بیماری آنقدر طولانی نبود که آسیب کلافه در حد بسته شدن آن باشده Osterby با روش شمارش نقطه‌ای در متد استریولوژی هم با میکروسکوپ نوری و هم با میکروسکوپ الکترونی افزایش حجم بافت مزانژیال را در کلافه‌های گلومرولی نشان داده است و او نشان داد که افزایش حجم کلافه‌ها در رت مشابه انسان ایجاد می‌شود، اگر چه مدت دیابت رتها طولانی‌تر از مدت دیابت این تحقیق بوده است (۱۰، ۱۷). تحقیقات فراوانی نشان داده است که علت اصلی مشکلات کلیه در دیابت گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها است (۱۸، ۱۹). گلیکوزیلاسیون غشای پایه در سد فیلتراسیون باعث بی‌کفایتی این سد شده و نشت مواد پلاسما از آن افزایش می‌یابد. گلیکوزیلاسیون بافت مزانژیال باعث تحریک سلولهای مزانژیال می‌شود؛ به طوری که قرار دادن سلولهای مزانژیال گلومرولی در یک محیط هیپرگلیسمیک به مدت دو هفته باعث تحریک رشد و سنتز سلول می‌شود (۵). Studer نشان داده است که فعالیت protein kinase C(PKC) کلافه گلومرولی در رت افزایش می‌یابد و PKC باعث تحریک سنتز ECM توسط سلولهای مزانژیال می‌شود (۲۰). Caglicro و همکارانش نیز نشان داده‌اند که اگر سلولهای

1. Extra Cellular Matrix

آندوتلیوم را در یک کشت با غلظت بالای D-گلوکز قرار دهیم mRNA فیبرونکتین دو برابر می‌شود (۱۵). از طرف دیگر، هم در انسان و هم در رت دیابتی ترومبوکسان که یک محصول متابولیسم اسید آراشیدونیک است افزایش می‌یابد و ماده باعث افزایش فعالیت PKC شده و در نتیجه فعالیت سلولهای مزانژیال افزایش می‌یابد (۱۸). این نتیجه با یافته‌های این تحقیق (افزایش بافت مزانژیال) که به صورت *in vivo* انجام گرفته است؛ مطابقت دارد. عامل دیگری که می‌تواند در ایجاد افزایش بافت مزانژیال مطرح شود آنژیوتانسین II است. این آنزیم علاوه بر نقش همودینامیک، در سلولهای مزانژیال نیز نقش تغذیه‌ای دارد (۲۱). افزایش فعالیت آنزیم تبدیل کننده آنژیو تانسین (ACE)[1] در بیماری دیابت دیده می‌شود. از آنجایی که این آنزیم آنژیوتانسین I را تبدیل به نوع II می‌کند، با به کار بردن مهار کننده ACE می‌توان از آسیب کلافه گلومرولی به نحو محسوسی جلوگیری کرد (۲۱). Remuzzi نیز با به‌کار بردن آنتاگونیست آنژیوتانسین II توانست عوارض دیابت را بر کلیه در رتهای دیابتی کاهش دهد (۲۲). مکانیسم اولیه در ایجاد آسیب بافت کلیوی را افزایش جریان خون کلیه می‌دانند که مدت کوتاهی بعد از ایجاد IDDM به وجود می‌آید (۶). این مکانیسم به عنوان یک تئوری همودینامیک مطرح می‌شود که باعث افزایش جریان خون و فشار خون در عروق میکرواسکولار کلیه می‌شود (۷). برخی محققین علت افزایش جریان خون کلیه را ناشی از هیپوکسی کلیوی می‌دانند، چرا که در محیط هیپرگلوکز میزان اکسیژن کاهش پیدا می‌کند (۱۹). علاوه بر این؛ در دیابت ترشح گلوکاگون و هورمون رشد افزایش می‌یابد و می‌توانند جریان خون کلیه را افزایش دهند (۱۰). Nitric Oxid (NO) نیز نقش مهمی در افزایش جریان خون کلیه دارد به طوری که ماده مهارکننده NO باعث افزایش فشار هیدروستاتیک در گلومرول می‌شود (۲۳). در هر صورت با توجه به افزایش بافت مزانژیال و حجم کلافه‌های گلومرولی در مدت ۴ ماه دیابتی بودن می‌توان اثرهای دیابت بر کلیه را در زمان کوتاهتری نیز پیدا کرد و از آنجایی که گلیکوزیلاسیون اولیه پروتئینها در دیابت قابل برگشت است ولی با گذشت زمان به شکل غیرقابل برگشت در آمده و منجر به درگیری بیشتر کلیه، عوارض وسیع‌تر و در نهایت از کار افتادن کلیه می‌شود، بنابراین پارامترهای تشخیصی زودتر، می‌توانند اهمیت فراوانی داشته باشند.

References

1. Sacks DB: Carbohydrates in teitz funda mental of chemistry. Burtis CA, Ashwood ER (eds), 4ed, 1996, pp 355-357
2. Rodger W: Non Insulin dependent (type II) disbetes mellitus. Can med Assoc J 1991; 145: 1571-1581
3. Elisa T, Viviens L: Incidence of renal failure in NIDDM: The oklohome indian diabetes study. Diabetes 1994; 43: 572-578
4. Lampeter EF: Inflamotory islet demage in patient bearing HLA-DR3 and or DR4 helpotypes doesnot lead to islet autoimmunty. Diabetologia 1994; 37: 471-475
5. Robert H, Heptin stall: Pahtology of the kidney 4ed. Volum II, little, Bronand company, 1992, pp 1715-1763
6. Tean D, Wilson Daniel W, Foster Henry M, Kronberg P, Reed L: Williams text book of endocrinology WB Saunders Company, 9ed, 1998, pp 937-1061
7. Angel ACS, Alen JJ, Johne T: Capiliary perssure in patients with NIDDM. Diabetes 1994; 43: 1198-1201
8. Susan TC: Effects of nonenzymatic glycosy lation of mesangial matrix proliferation of mesangial cells. Diabetes 1991; 40: 540-547
9. William TC, Zhong QW: Liver and kidney tissue membranes as tissue markers for nonenzymatic glycosylition. Diabetes 1991; 40: 902-906
10. Osterby R: Glyomerular structural changes in type I (Insulin-dependent) diabetes mellitus: Causes, consequence, and prevention. Diabetologia 1992; 35: 503-512
11. Strivastava Y, Ven Kala KH: Effects of momrdiea charanita linn. P mouse Aqueous extract on cataractogenesis in murrian alloxan diabeties. Pharmaco Res Commur 1998; 20: 201-204
12. Berdbury P, Kithe GR: Theory and practice of histological tehniques. JD Banerolt, Alan S, Turner DK (eds). 3ed, Churchill living stone, 1990, pp 119-142
13. Michael WS, David MB, Michael Maur S: Diabetic glomerulopathy folloing unilaterel nefrectomy in the rat. Diabetes 1978; 1: 35-40
14. Pinter GG, Atkins JL: Role of postglomerular microvessels in patho physiology of diabetic nephropathy. Diabetes 1991; 40: 791-795
15. Enrico C: Characteristies and mechanisms of hight Glucose Indused human endothellial cells. Diabetes 1991; 40: 100-109
16. Masenori W, Spiro MJ: Synthesis of type VI collagen by cultured glomerular and comparison of its regulation by Glucose and other factors with that of type IV collagen. Diabetes 1994; 43: 95-103
17. Antionette M, David MB: Effects of IGF-α and glucose on protein and proteoglycan synthesis by human fetal mesengial cell in culture. Diabetes 1991; 40: 1346-1354
18. Lee R, Goldstein M, Helprin M: Hyperchloremic metabolic acidosis in diabetes mellitus. Diabetes 1978: 1: 16-20
19. Sushil KJ, Steren NL, Duet J: Reduced vitamin E and in creased lipofusion products in erythrocytes of diabetic rats. Diabeties 1991; 40: 1241-1248
20. Rodecca KS, Patritia AC: Role for protein kinase C

1. Angiotensin Converting Enzyme

in the mediation fibronectin accumulation by mesengial cells growth in high glucose medium. Diabetes 1993; 42: 118-126
21. Varnes D, Diiley RJ, Cooper ME: Vascular changes in the diabetic kidney, effects of ACE inhibition. J Diabet Comp 1995; 9: 296-300
22. Remuzzi A, Fassi A, Sengali F: Pervention of renal injury in diabetic MWF rats by angiotensin II antagonism. Exp Nephrol 1998; 60: 28-38
23. Fransis BG, Rolad CB: Role of Nitric oxide in renal hemodynamies. J Nephrol 1999; 19: 242-250