

Markers of endothelial dysfunction as predictors of gestational hypertension and preeclampsia

Markery endotelovej dysfunkcie ako prediktory gestačnej hypertenzie a preeklampsie

Kolesárová E¹, Janičko M²

¹Neštátna interná a nefrologická ambulancia, Medikol s.r.o., Košice, Slovenská republika

Kolesarova E, Janicko M. **Markers of endothelial dysfunction as predictors of gestational hypertension and preeclampsia.** Cardiology Lett. 2015;24(6):430–434

Abstract. *Objective:* To determine markers of endothelial dysfunction (ED) during pregnancy, identifying risk patients in terms of the development of gestational hypertension and possible development of cardiovascular (CV) disease in later life, and the evaluation of later cardiovascular risk in women with abortions in anamnesis.

Materials and methods: A prospective cohort study was performed on 61 pregnant patients during the first trimester of pregnancy, with anamnesis of risk for developing gestational hypertension. While 11 patients had pre-existing arterial hypertension (AH), 10 pregnant women had developed gestational AH and 40 women did not have hypertensive disorders. Their average age was 33.49 ± 3.99 years. Patients were examined in three stages: before the 20th week of pregnancy, after the 20th week of pregnancy and after puerperium. As a marker of ED in our work we monitored the asymmetric dimethylarginine (ADMA), C-reactive protein determined by the ultrasensitive method (CRPus), uric acid, microalbuminuria (MAU), and procoagulant factors of D-dimer and fibrinogen.

Results: We found a significant difference in levels of CRPus before 20th week of pregnancy. Patients who later developed gestational AH had about 3 times higher average values of CRPus before 20th week, compared with patients without AH (13.77 ± 3.17 mg/ml vs. 5.29 ± 4.31 mg/ml, $p = 0.002$), and even higher values than patients with pre-existing AH (13.77 ± 3.17 mcg/ml vs. 7.98 ± 3.85 mg/ml, $p = 0.002$). An important predictor of gestational AH in our study has clearly proven to be CRPus, whose significantly higher level before 20th week of pregnancy identifies patients at risk for developing gestational AH. We did not find statistically significant difference in levels of ADMA among the three groups of patients. Levels of ADMA were significantly higher after puerperium in women with an anamnesis of previous spontaneous abortions, which supports the hypothesis that these patients also have an increased cardiovascular risk in later life.

Discussion and conclusion: For common practice we recommend routine determination of CRPus in the first half of pregnancy to identify women at risk of developing gestational hypertension or preeclampsia. Fig. 1, Tab. 1, Ref. 7, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Key words: gestational hypertension – CRPus – endothelial dysfunction – cardiovascular risk

Kolesárová E, Janičko M. **Markery endotelovej dysfunkcie ako prediktory gestačnej hypertenzie a preeklampsie.** Cardiology Lett. 2015;24(6):430–434

Abstrakt. *Cieľ:* Stanovenie markerov endotelovej dysfunkcie (ED) počas gravidity, identifikácia rizikových pacientok vzhľadom na vývoj gestačnej hypertenzie a možného vývoja kardiovaskulárnych (KV) chorôb v neskoršom živote týchto žien a vyhodnotenie neskorého KV rizika u žien s abortami v anamnéze.

Z ¹Neštátnej internej a nefrologickej ambulancie, Medikol s.r.o., Košice
a ²I. internej kliniky LF UPJŠ, Košice, Slovenská republika
Do redakcie došlo dňa 17. júna 2015; prijaté dňa 1. augusta 2015

Adresa pre korešpondenciu: MUDr. Eva Kolesárová, PhD., Neštátna interná a nefrologická ambulancia, Masarykova 17/A, Košice, Slovenská republika, e-mail: eva.kolesarova@nefrologia.sk

Pacienti: išlo o prospektívnu kohortovú štúdiu, ktorá zahŕňala 61 gravidných pacientok v prvom trimestri gravidity s anamnézou rizika pre vznik gestačnej hypertenzie, pričom 11 pacientok malo preexistujúcu artériovú hypertenziu (AH), 10 tehotných malo neskôr gestačnú AH a 40 žien nemalo žiadnu z hypertenzných porúch. Ich priemerný vek bol $33,49 \pm 3,99$ roka. Pacientky boli vyšetrené v troch etapách, a to pred 20. týždňom gravidity, po 20. týždni gravidity a po ukončení šestonedelia. Ako markery ED sme v našej práci sledovali asymetrický dimetylarginín (ADMA), C-reaktívny proteín stanovený ultrasenzitívnou metódou (CRPus), kyselinu močovú, mikroalbuminúriu (MAU), prokoagulačné parametre D-dimér a fibrinogén.

Výsledky: Zistili sme významný rozdiel v hodnote CRPus pred 20. týždňom gravidity. Pacientky, u ktorých sa neskôr vyvinula gestačná AH, mali trikrát vyššie priemerné hodnoty CRPus pred 20. týždňom v porovnaní s pacientkami bez AH ($13,77 \pm 3,17 \mu\text{g/ml}$ vs. $5,29 \pm 4,31 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,002$) a vyššie hodnoty ako pacientky s preexistujúcou AH ($13,77 \pm 3,17 \mu\text{g/ml}$ vs. $7,98 \pm 3,85 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,002$). Ako významný prediktor gestačnej AH bol jednoznačne CRPus, ktorého významne vyššia hladina pred 20. týždňom gravidity identifikuje pacientky rizikové vzhľadom na vývoj gestačnej AH. Nezistili sme štatisticky významný rozdiel v hladine ADMA medzi tromi sledovanými skupinami pacientok. Hodnoty ADMA boli významne vyššie po šestonedelí u žien s anamnézou prekonaných spontánných abortov, čo podporuje hypotézu, že i tieto pacientky majú zvýšené KV riziko v neskoršom veku.

Diskusia a záver: Pre bežnú prax možno odporúčať rutinné stanovenie parametra CRPus v prvej polovici gravidity za účelom identifikácie žien rizikových vzhľadom na vznik gestačnej hypertenzie, prípadne pre eklampsie. Obr. 1, Tab. 1, Lit. 7, Online full text (Free, PDF) www.cardiology.sk

Kľúčové slová: gestačná hypertenzia – CRPus – endotelová dysfunkcia – kardiovaskulárne riziko

V ostatných rokoch pribúdajú dôkazy o vzťahu artériovej hypertenzie (AH) v gravidite s budúcim KV postihnutím. Je pravdepodobné, že AH v gravidite je nezávislým rizikovým faktorom pre KV choroby v ďalšom živote. Hemodynamické zmeny v gravidite demaskujú nerozpoznané abnormality, ako je endotelová dysfunkcia (ED), ktorá je pravdepodobne jedným z patogenetických mechanizmov pri preeklampsii a pri KV chorobách (1). Rizikové faktory, najmä metabolické faktory, ako obezita, inzulínová rezistencia, lipidové abnormality, trombofília, môžu viesť k preeklampsii a ku KV chorobám v rôznych časových etapách života ženy. Hypertenzné poruchy v tehotenstve sú pravdepodobne doposiaľ neidentifikovaným, respektíve podhodnoteným faktorom pre akceleráciu aterosklerózy a jej komplikácie vo vyššom veku a mali by byť zohľadnené pri vyšetrení rizikového profilu pacientky vzhľadom na KV chorôb a metabolický syndróm (2). Dôležité prognostické informácie o vývoji ED možno zistiť sledovaním niektorých parametrov v periférnom krvnom obeh. V našej práci sme v súbore 61 žien počas gravidity ako marker ED sledovali asymetrický dimetylarginín (ADMA – selektívny inhibítor syntázy oxidu dusnatého), C-reaktívny proteín stanovený ultrasenzitívnou metódou, mikroalbuminúriu, kyselinu močovú a prokoagulačné parametre fibrinogén a D-Dimér.

Charakteristika súboru

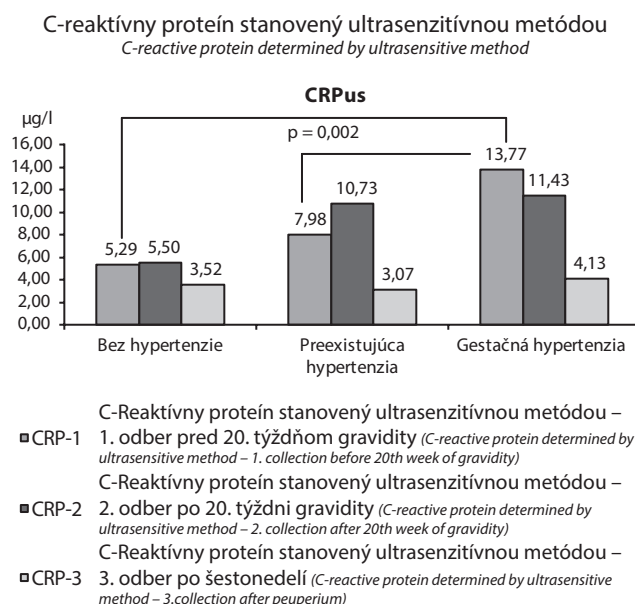
V období od januára 2009 do decembra 2011 sme prospektívne vyšetrili súbor 61 gravidných pacientok v prvom trimestri gravidity s anamnézou rizika pre vznik gestačnej hypertenzie, pričom 11 pacientok malo preexistujúcu AH, 10 tehotných neskôr gestačnú AH, 40 žien nemalo žiadnu

z hypertenzných porúch. Ich priemerný vek bol $33,49 \pm 3,99$ roka. Prvorodičiek bolo 23, viacrodičiek 38, spontánne aborty v anamnéze malo 16 pacientok. Ani u jednej zo žien nebol diagnostikovaný preexistujúci diabetes mellitus, neskôr ani gestačný. Všetky pacientky s AH, gestačnou či preexistujúcou, boli liečené v súlade s odporúčaniami ESC/ESH alfametyldopou, v prípade zlej tolerancie tejto liečby betablokátorom nebivololom, prípadne kombináciou týchto liekov.

Keďže pre vznik a diagnózu preeklampsie je významný 20. týždeň tehotenstva, pacientky boli vyšetrené v troch etapách. Prvé vyšetrenie bolo realizované pred 20. týždňom gravidity (10. – 19. týždeň), druhé vyšetrenie po 20. týždni gravidity (20. – 30. týždeň) a tretie vyšetrenie po pôrode, po ukončení šestonedelia. Každé vyšetrenie pozostávalo z podrobnej anamnézy, fyzikálneho a laboratórneho vyšetrenia. Diagnóza AH bola definovaná podľa platných kritérií ESC/ESH ako krvný tlak TKs ≥ 140 mmHg a/alebo TKd ≥ 90 mmHg. Súbor pacientok sme po ukončení sledovania rozdelili do troch skupín: 1. skupina 40 pacientok bez diagnostikovanej AH, 2. skupina 11 žien s preexistujúcou AH a 3. skupina 10 pacientok s gestačnou AH.

Štatistická analýza

Hodnoty sú prezentované ako priemer $\pm$ štandardná odchýlka. Štatistickú významnosť rozdielov medzi kontinuálnymi premennými sme testovali podľa Kruskala a Wallisa. Pri hľadaní prediktorov vzniku gestačnej hypertenzie sme použili logistickú regresiu prispôbenú na vek a diagnostikovanú trombofiliu a počet predchádzajúcich spontánných



Obrázok 1 Vývoj hodnôt C-reaktívneho proteínu stanoveného ultrasenzitívnou metódou (CRP-us) u pacientok bez hypertenzie, s preexistujúcou hypertenziou a s gestačnou hypertenziou

Figure 1 The development of the values of C-reactive protein levels determined by ultrasensitive method (CRPus) in patients without hypertension, with pre-existing hypertension and gestational hypertension

Pacientky s gestačnou hypertenziou mali trikrát vyššie priemerné hodnoty CRPus pred 20. týždňom ako pacientky bez hypertenzie a významne vyššie ako pacientky s preexistujúcou hypertenziou. CRPus pred 20. týždňom – prediktor rozvoja gestačnej hypertenzie s pomerom šancí 1,527 (95 % interval spoľahlivosti 1,035 – 2,251; $p = 0,033$). (Women patients with gestational hypertension had 3x higher average values CRPus before 20th week than woman patients without hypertension and significantly higher than patients with pre-existing hypertension. CRPus before 20th week is predictor of development of gestational hypertension with an odds ratio of 1.527 (95% confidence interval 1.035 to 2.251; $p = 0,033$).

abortion. Rozdiely v parametroch v čase (medzi odbermi pred 20. týždňom, po 20. týždni a po ukončení šestonedelia) sme hodnotili ANOVA testom pre tri príbuzné vzorky. Za štatisticky významnú hodnotu sme zvolili $p < 0,05$.

Výsledky

Pacientky bez AH mali približne o polovicu nižšie hodnoty CRP ako pacientky s preexistujúcou AH ($5,29 \pm 4,31 \mu\text{g/ml}$ vs. $7,98 \pm 3,85 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,002$). Najzaujímavejším zistením je, že ženy, u ktorých sa neskôr vyvinula gestačná AH, mali približne trikrát vyššie priemerné hodnoty CRPus pred 20. týždňom v porovnaní s pacientkami bez AH ($13,77 \pm 3,17 \mu\text{g/ml}$ vs. $5,29 \pm 4,31 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,002$) a dokonca vyššie hodnoty ako pacientky s preexistujúcou AH ($13,77 \pm 3,17 \mu\text{g/ml}$ vs. $7,98 \pm 3,85 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,002$). Tento výsledok sa vyskytol aj pri hodnote CRPus stanovenej po 20. týždni gravidity. Po

ukončení šestonedelia sme však už žiadny rozdiel v hodnote CRPus nenašli (**obrázok 1 a tabuľka 1**).

Ďalej sme zistili, že priemerné hodnoty kyseliny močovej pred 20. týždňom mali pacientky s preexistujúcou AH vyššie ako pacientky bez AH ($241,3 \pm 39,0 \mu\text{mol/l}$ vs. $187,605 \pm 36,30 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,002$), podobne aj pacientky s gestačnou AH oproti pacientkam bez AH ($236,5 \pm 65,8 \mu\text{mol/l}$ vs. $187,6 \pm 36,3 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,002$). Po 20. týždni gravidity pacientky s preexistujúcou AH mali priemerné hodnoty kyseliny močovej vyššie ako pacientky bez AH ($225,29 \pm 79,54 \mu\text{mol/l}$ vs. $207,96 \pm 44,82 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,33$), tak isto pacientky s gestačnou AH mali priemerné hodnoty kyseliny močovej vyššie ako pacientky bez AH ($255,94 \pm 40,06 \mu\text{mol/l}$ vs. $207,96 \pm 44,82 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,33$). Po ukončení šestonedelia u pacientok s preexistujúcou AH pretrvávali zvýšené hodnoty kyseliny močovej v porovnaní s pacientkami bez AH ($325,4 \pm 64,8 \mu\text{mol/l}$ vs. $245,9 \pm 60,2 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,004$). Zvýšené hodnoty kyseliny močovej pretrvávali aj v skupine s gestačnou AH oproti pacientkam bez AH ($280,0 \pm 76,7 \mu\text{mol/l}$ vs. $245,9 \pm 60,2 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,004$).

Zaujímavé zistenie je, že v priebehu gravidity sme nezaznamenali rozdiel v priemernej hodnote MAU. Po ukončení šestonedelia však mali pacientky bez AH významne nižšie priemerné hodnoty MAU v porovnaní s pacientkami s preexistujúcou AH ($7,6 \pm 16,2 \text{ mg/24 h}$ vs. $20,5 \pm 30,4 \text{ mg/24 h}$, $p = 0,004$) či gestačnou AH ($7,6 \pm 16,2 \text{ mg/24 h}$ vs. $21,5 \pm 21,0 \text{ mg/24 h}$, $p = 0,004$).

Prekvapujúco sme ale nezistili štatisticky významný rozdiel v hladine ADMA medzi týmito tromi skupinami pacientok v žiadnej z odobratých vzoriek. Odber ADMA pred 20. týždňom však mali len štyri pacientky s gestačnou AH. U pacientok s následným rozvojom gestačnej AH bol trend k vyšším hodnotám ADMA v prvom odbere oproti pacientkam s preexistujúcou AH a pacientkam bez AH ($0,39 \pm 0,14 \mu\text{mol/l}$ vs. $0,3 \pm 0,08 \mu\text{mol/l}$ vs. $0,30 \pm 0,10 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,293$).

Vplyv spontánnych abortov na stav endotelu – dynamika ADMA a CRPus

V súbore bolo 16 žien, ktoré mali jeden a viac spontánnych abortov v anamnéze. Tieto pacientky mali významne vyššiu hladinu ADMA po šestonedelí ($0,44 \pm 0,11 \mu\text{mol/l}$ vs. $0,36 \pm 0,10 \mu\text{mol/l}$, $p = 0,008$). Táto skutočnosť nevylučuje vývoj ED u týchto pacientok v neskoršom živote. V ďalších sledovaných parametroch sme nepozorovali významné rozdiely oproti ostatným skupinám pacientok.

Diskusia a záver

Vzhľadom na možný vývoj KVCH sme sa sústredili na sledovanie vývoja markerov ED, pričom jednoznačne signifikantný výsledok sme získali pri CRPus. Zaujímavým zistením je, že pacientky, u ktorých sa neskôr vyvinula gestačná AH, mali približne trikrát vyššie priemerné hodnoty

Tabuľka 1 Prehľad hodnôt markerov endotelovej dysfunkcie u pacientok bez hypertenzie, s preexistujúcou hypertenziou a s gestačnou hypertenziou v troch sledovaných obdobiach*Table 1* Summary of levels of markers of endothelial dysfunction in patients without hypertension, with pre-existing hypertension and gestational hypertension in three reporting periods

	Bez hypertenzie (Without hypertension)			Preexistujúca hypertenzia (Pre-existing hypertension)			Gestačná hypertenzia (Gestational hypertension)			p
	Počet (Count)	Priemer (Average)	Štandardná odchýlka (Standard deviation)	Počet (Count)	Priemer (Average)	Štandardná odchýlka (Standard deviation)	Počet (Count)	Priemer (Average)	Štandardná odchýlka (Standard deviation)	
ADMA-1 (μmol/l)	40	0,30	0,10	11	0,33	0,08	4	0,39	0,14	0,293
ADMA-2 (μmol/l)	39	0,33	0,11	10	0,30	0,11	3	0,31	0,09	0,882
ADMA-3 (μmol/l)	39	0,39	0,11	10	0,42	0,09	8	0,31	0,12	0,123
CRP-1 (μg/ml)	39	5,29	4,31	11	7,98	3,85	4	13,77	3,17	0,002
CRP-2 (μg/ml)	38	5,50	5,80	10	10,73	7,91	3	11,43	5,44	0,009
CRP-3 (μg/ml)	39	3,52	8,66	10	3,07	1,62	8	4,13	4,31	0,160
D-D-1 (μg/l)	39	210,57	157,16	11	106,75	44,10	4	171,68	29,99	0,061
D-D-2 (μg/l)	38	332,21	198,11	10	207,43	157,10	6	371,07	198,53	0,064
D-D-3 (μg/l)	36	133,30	131,20	11	122,80	114,90	8	245,30	200,20	0,074
FIBR-1 (g/l)	38	3,50	0,70	11	3,80	1,10	4	3,80	1,00	0,491
FIBR-2 (g/l)	38	3,91	0,75	10	4,35	1,22	6	4,03	0,78	0,626
FIBR-3 (g/l)	36	3,05	0,87	11	2,59	0,29	8	3,11	0,68	0,271
KM-1 (μmol/l)	39	187,60	36,30	11	241,30	39,00	4	236,50	65,80	0,002
KM-2 (μmol/l)	39	207,96	44,82	10	225,29	79,54	5	255,94	40,06	0,033
KM-3 (μmol/l)	38	245,90	60,20	11	325,40	64,80	8	280,00	76,70	0,004
MAU-1 (mg/24 h)	35	15,10	16,50	9	16,70	12,60	4	16,70	14,40	0,807
MAU-2 (mg/24 h)	33	16,56	36,55	8	10,90	10,14	5	13,23	18,37	0,840
MAU-3 (mg/24 h)	32	7,60	16,20	11	20,50	30,40	7	21,50	21,00	0,004

ADMA – asymetrický dimetylarginín (*asymmetric dimethylarginine*), CRP-C – reaktívny proteín stanovený ultrasenzitívnou metódou (*reactive protein determined by ultra-sensitive method*), D-D – D-dimér (*D-dimer*), Fibr – fibrinogén (*fibrinogen*), KM – kyselina močová (*uric acid*), MAU – mikroalbuminúria (*microalbuminuria*), p – štatistická významnosť (*statistical significance*), ADMA-1, CRP-1, D-D-1, Fibr-1, KM-1, MAU-1 – laboratórne parametre získané pred 20. týždňom gravidity (*laboratory parameters obtained before 20th week of gestation*), 2 – po 20. týždni gravidity (*second – after 20th week of pregnancy*), 3 – po šiestonedelí (*third – after the puerperium*).

Významné korelácie sú uvedené tučným písmom. (*Significant correlations are quoted in bold letters*).

CRPus pred 20. týždňom v porovnaní s pacientkami bez AH a dokonca vyššie hodnoty ako pacientky s preexistujúcou AH. Hodnota CRPus stanovená pred 20. týždňom trvania gravidity sa ukázala ako významný prediktor rozvoja gestačnej AH. Autori Batashki et al. (3) v svojej práci sledovali 60 gravidných žien a sledovali tiež ako marker akútnej fázy CRPus. Zistili štatisticky významne vyššie hodnoty CRP medzi pacientkami s preeklampiou a pacientkami s normálnou tehotnosťou.

Ďalším zistením je, že mikroalbuminúria u pacientok s preexistujúcou hypertenziou mala stúpajúci trend počas celej gravidity a táto sa naďalej zvyšovala aj po šiestonedelí, oproti tehotným bez AH, u ktorých MAU po ukončení gravidity významne klesla. Podobné výsledky dosiahli autori Singh et al. (4), ktorí vo svojej štúdií 144 pacientok potvrdili signifikantne vyššie hodnoty MAU medzi 24. – 28. týždňom u žien, u ktorých sa neskôr vyvinula preeklampsia.

Prekvapujúco sme nezistili štatisticky významný rozdiel v hladine ADMA medzi tromi sledovanými skupinami pacientok v žiadnej z odobratých vzoriek. Treba však po-

znamenat, že u týchto pacientok s následným rozvojom gestačnej AH bol trend k vyšším hodnotám ADMA v prvom odbere na začiatku gravidity. Na rozdiel od nás sa autorom Speer et al. (5) na relatívne menšom súbore 58 pacientok podarilo dokázať zvýšené hodnoty ADMA v prvej polovici gravidity u žien, u ktorých sa neskôr vyvinula preeklampsia. Podobne aj Slaghekke et al. (6) potvrdzujú úlohu zvýšených hladín ADMA pri rozvoji preeklampsie. Hodnoty ADMA boli v našom súbore signifikantne vyššie po šiestonedelí u pacientok s anamnézou prekonaných spontánných abortov, čo potvrdzuje hypotézu, že i tieto pacientky majú zvýšené KV riziko v neskoršom veku. To dokazuje aj štúdia Kharazmi et al. (7), ktorí potvrdili na základe populačnej prospektívnej štúdie 11 518 žien, že ženy, ktoré prekonali spontánny abort, majú neskôr počas života podstatne vyššie riziko infarktu myokardu.

Pre bežnú prax možno odporúčať rutinné stanovenie parametra CRPus pred 20. týždňom gravidity, respektíve v prvom trimestri, za účelom identifikácie žien rizikových vzhľadom na vznik gestačnej AH, prípadne preeklampsie. Nemenej dō-

ležité je následné sledovanie pacientok po ukončení gravidity komplikovanej niektorou z hypertenzných porúch a pacientok s prekonanými spontánnymi abortami v anamnéze, pre ich zvýšené KV riziko v neskoršom živote.

Literatúra

1. Melnik T. Preeclampsia identifies women at risk for cardiovascular disease. Preeclampsia Foundation Position Statement, Issued October 27, 2006; www.preeclampsia.org/PositionStmt_lateEffects_Oct06.pdf (19.01.2014).
2. Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, Berra K, Bushnell CH, Dolor RJ, et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1230-1250.
3. Batashki I, Milchev N, Topalovska D, Uchikova E, Mateva N. C-reactive protein in women with pre-eclampsia. *Akush Ginekol (Sofia)* 2006;45(Suppl 1):47-50.
4. Singh R, Tandon I, Deo S, Natsu SM. Does microalbuminuria at mid-pregnancy predict development of subsequent pre-eclampsia? *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39(2):478-483.
5. Speer PD, Powers RW, Frank MP, Harger G, Markovic N, Roberts JM. Elevated asymmetric dimethylarginine concentrations precede clinical preeclampsia but not pregnancies with small for gestational age. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198(1):112.
6. Slaghekke F, Dekker G, Jefferies B. Endogenous inhibitors of nitric oxide and preeclampsia: a review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006;19(8):447-452.
7. Kharazmi E, Dossus L, Rohrmann S, Kaaks R. Pregnancy loss and risk of cardiovascular disease: a prospective population-based cohort study (EPIC-Heidelberg). *Heart* 2011;97(1):49-54.