

Hepatitis B Virus'a Bağlı Kronik Karaciğer Hastalıklarında Büyük Hücreli Hepatosellüler Displazinin Önemi

The Importance of Large Cell Change in Hepatitis B Virus-Related Chronic Liver Diseases

Funda Yılmaz¹, Gül Yüce¹

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, İzmir

Hepatit B virus enfeksiyonuna bağlı kronik hepatit, siroz zemininde gelişen hepatosellüler karsinom tanısı alan toplam 60 olgunun formalinle tespit edilip parafine gömülmüş karaciğer biyopsileri, büyük hücreli değişiklik varlığı ve şiddeti ile Prolifere olan Hücre Nukleus Antijeni immünoaktivitesi ile korelasyonu açısından araştırıldı.

Büyük hücreli değişik oranı kronik hepatitte % 25, sirozda % 50 ve siroz zemininde gelişen Hepatosellüler karsinomda % 55 idi. Şiddetli büyük hücreli değişik tümör içeren grupta daha sık bulundu ve büyük hücreli değişik içeren olgular, içermeyenlere oranla daha yaşlı idi, fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Büyük hücreli değişiklik hücreleri, tümör grubundaki iki olgu dışında PCNA ile pozitif reaksiyon vermedi. Büyük hücreli değişiklik varlığı ile PCNA indeksi arasında korelasyon saptanmadı. Sonuç olarak verilerimiz büyük hücreli değişikliğin preneoplastik olmadığını ima etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virus, büyük hücreli displazi, proliferating cell nuclear antigen

Formalin-fixed and paraffin-embedded liver biopsy specimens of sixty cases of Hepatitis B virus related chronic hepatitis, cirrhosis of the liver and cirrhosis associated with hepatocellular carcinoma were evaluated for the occurrence and severity of large cell change and its correlation with proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity.

The occurrence of chronic hepatitis, cirrhosis and cirrhosis associated with hepatocellular carcinoma was 25%, 50% and 55%, respectively. Although severe large cell change was more frequent in the tumour group, and cases with large cell change were older than cases without large cell change, these results were not statistically significant. Large cell change cells did not show positive reaction with proliferating cell nuclear antigen, except for two cases in the tumour group. No correlation was detected between the proliferating cell nuclear antigen index and occurrence of large cell change. Our data suggests that large cell change is not a preneoplastic change.

Key Words : Hepatitis B Virus, large cell dysplasia, proliferating cell nuclear antigen

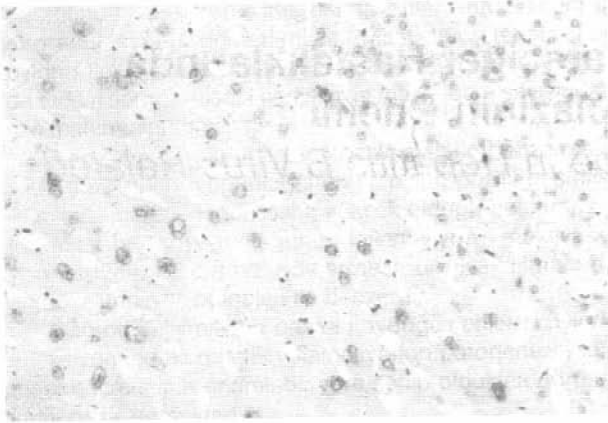
Karaciğerde büyük hücreli displazi ya da son yıllarda daha çok kabul gören adı ile büyük hücreli değişiklik (BHD) nükleer ve sitoplazmik genişleme, nükleer pleomorfizm ve hiperkromazi, normal nükleus / sitoplazma oranı ve bazen multipl nükleus ve nükleolusların varlığı ile karakterli bir morfolojik antitedir⁽¹⁾. İlk kez HbsAg pozitif hepatosellüler karsinomlu (HSK) hastalarda tanımlanmış ve preneoplastik olduğu vurgulanmıştır⁽¹⁾. Daha sonraları, karaciğerde küçük hücreli bir displazi tipinin daha tanımlanması nedeniyle büyük hücreli displazi olarak isimlendirilmiştir⁽²⁾. Malignite prekürsörü olduğu yönündeki çelişkili veriler ve kuşku nedeniyle de büyük hücreli değişiklik olarak isimlendirilmesi önerilmiştir⁽³⁾. BHD değişik etiyolojilere bağlı siroz ve HSK'da bulunabilirse de, hepatit B virusu (HBV) ile arasında kuvvetli bir ilişkinin varlığı öne sürülmüştür^(1,4).

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), proliferasyon gösteren dokularda sentez edilen, sentez hızı hücrelerin proliferasyon ve DNA sentezi hızı ile doğru orantılı olan bir proteindir⁽⁵⁾. Bu çalışmada HBV'na bağlı kronik karaciğer hastalıklarının çeşitli evrelerinde BHD'nin varlığı ve oranı araştırılmış ve immünohistokimyasal olarak araştırılan PCNA indeksi ile ilişkisi ve bu hücrelerin proliferatif aktivitesi sorgulanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Ege Ü.T.F. Patoloji Anabilim Dalı'nın 1979-1993 yılları arası arşivinden seçilen 20 kronik hepatit B (KHB), 20 kronik hepatit B'ye bağlı siroz (KHBS) ve 20 KHB'ye bağlı siroz zemininde gelişmiş hepatosellüler karsinom (KHBS-HSK) olgusu alındı. Tüm olgularda etyolojik etken olarak HBV'nun varlığı serolojik yada dokuda immünohistokimyasal olarak kanıtlandı. Kontrol grubu olarak 10 normal karaciğer biyopsisi seçildi. İncelenen doku örnekleri KHB ve KHBS grubunda ve HSK içeren 13 olguda iğne biyopsi materyali, diğer HSK olgularında ise kama biyopsisi (n:5) ve parsiyel hepatektomi (n:2) materyali idi.

Tüm olgularda Hematoksilen-Eozin ile boyalı kesitler



Resim 1: BHD içeren siroz olgusunda BHD alanındaki hücrelerde nükleus ve sitoplazmada irileşme, nükleer polimorfizm, bazı hücrelerde birden fazla nükleus varlığı (HE, x400).

Işık mikroskopunda BHD'nin varlığı ve varolan olgularda şiddeti açısından değerlendirildi. BHD varlığı Anthony ve arkadaşlarının ⁽¹⁾ kullandığı kriterler ile değerlendirildi (Resim 1). Değerlendirme sırasında, HBV ile ilişkili kronik karaciğer hastalıklarında izlenebilen nükleer hiperkromazi ve nükleer polimorfizm ile ayırıcı tanı yapıldı. BHD'nin şiddeti Cohen ve arkadaşlarının (6), kullandığı kriterler modifiye edilerek aşağıda belirtildiği şekilde iki kategoriye ayrıldı:

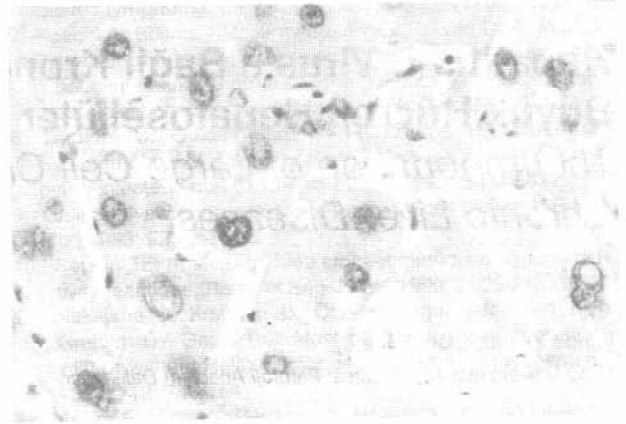
Hafif BHD: BHD hücrelerinin küçük gruplar halinde ve dağınık halde bulunması,

Şiddetli BHD: BHD hücrelerinin küçük gruplar halinde fakat altından fazla odak halinde bulunması veya lobül yada rejenere nodül yapılarının büyük bir kısmını tutması.

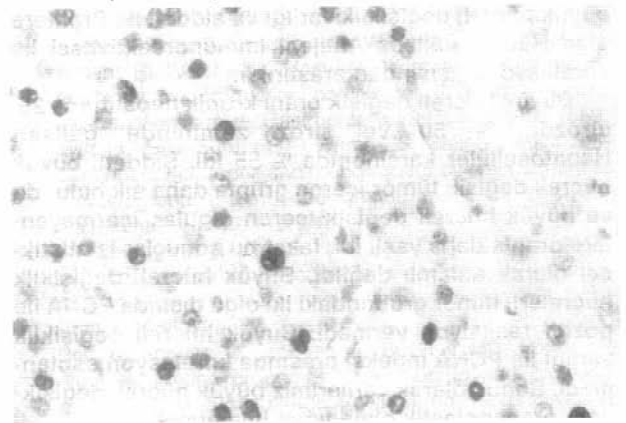
İmmünohistokimyasal yöntem:

Jelatinle kaplı lam üzerine alınan 4 mikron kalınlığında kesitler bir gece oda ısısında havada kurutuldu, deparafinize ve rehidrate edildi, %0.5 hidrojen peroksit-metanol'de 15 dk inkübasyondan sonra phosphate-buffered saline (PBS) ile yıkanıp, non-spesifik antikor bağlanmasının engellemek için protein blok solüsyonu (normal blocking serum, DAKO, Denmark) ile 20 dk inkübe edildi. Kesitler daha sonra, araştırmanın yürütüldüğü laboratuvar koşullarında optimum dilüsyonu 1:80 ve inkübasyon süresi 1 saat olarak saptanan PC 10 antikor (DAKO, M879, Denmark) ile inkübe edildi. İmmünohistokimyasal boyama daha sonra işaretlenmiş streptavidin ve biotin yöntemi (DAKO LSAB kit, K680, Denmark) ile sürdürüldü. İnkübasyonlar arasındaki tüm yıkamalar için PBS kullanıldı. Amino ethyl carbazole (AEC) kromojen, Mayer hematoksisileni ise zemin boyası olarak kullanıldı. Negatif kontrol için negatif kontrol solüsyonu (DAKO, N1556, Denmark), pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kesitleri kullanıldı.

PCNA boyanma indeksinin sayımı; alan bölmeli bir oküler (x10) yerleştirilen standart ışık mikroskopunda x40 objektif ile rasgele seçilen toplam 10 alanda 1000 hepatosit sayıldı. Bu alanlarda granüler yada diffüz tüm



Resim 2: KHBS grubundan bir olguda resmin sol yanındaki hepatositlerde PCNA pozitifliği izlenirken, sağ taraftaki büyük hücreli değişiklik gösteren hücrelerde PCNA ile boyanma izlenmemekte (AEC, x200).



Resim 3: KHBS zemininde hepatosellüler karsinom içeren olguda nontümoral dokudan bir görünüm, resmin sol üst köşesindeki küçük rejenere hücrelerde ve resim orta kısmındaki BHD gösteren hepatositlerde nükleer PCNA pozitifliği (AEC, x200).

nükleer boyanmalar, değerlendirmede sübjektiviteye neden olmamak için pozitif kabul edildi. PCNA boyanma indeksi, pozitif hücrelerin sayısı olarak ifade edildi.

İstatistiksel analiz Tek yönlü Anova ve T testi kullanıldı.

BULGULAR

Olguların yaşa ve cinse göre dağılımı, hafif ve şiddetli BHD'nin tanı gruplarına göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Tümör içeren grup, hepatit ve siroz gruplarından anlamlı şekilde yaşlıydı (SD: 2/57; F= 8.11; p<.001). Tanılara bakılmaksızın BHD olan (14; ort: 51,78; SS: 15.1) ve olmayan (34; ort: 42,67; SS: 12.24) olgular yaş açısından karşılaştırıldığında, BHD içeren grubun daha yaşlı olduğu saptandı fakat bu istatistiksel öneme ulaşmıyordu. Tanılar dikkate alınmadan, BHD'nin şiddeti açısından olguların yaş ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmadı (F: ,759; SD: 5,36; p>.05)

	Normal KC	KHB	KHBS	KHBS-HSK
N	10	20	20	20
Ortalama Yaş	36	38.65(SS:12.85)	43.651(SS:8.51)	56.75 (SS:1.75)
Cinsiyet (E/K)	4/6 (% 40/% 60)	13/7 (% 65/% 35)	14/6 (% 70/% 30)	18/2 (% 90/% 10)
Hafif BHD	0	3 (% 15)	6 (% 30)	5 (% 25)
Şiddetli BHD	0	2 (% 10)	4 (% 20)	6 (% 30)
PCNA İNDEKSİ	25±18.53	191.40±48.31	167.95±35.81	248.50±63.04

Tablo 1 : Olguların yaşa ve cinse göre dağılımı, tanı gruplarında BHD oranları ve PCNA indeksleri.

BHD görülme sıklığı hepatit grubunda % 20, siroz grubunda % 25 ve tümör içeren siroz grubunda % 55 idi. Tanı grupları BHD'nin derecesi dikkate alınmadan sadece BHD varlığı ve yokluğu açısından karşılaştırıldığında her üç tanı grubu arasında anlamlı farklılık bulunmadı. ($F=,571$; $p>.05$) Şiddetli BHD, tümör içeren grupta daha yüksek olmakla birlikte bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

PCNA pozitifliği, değişik yoğunluklarda, granüler yada diffüz nükleer boyanma şeklinde idi (Resim 2). BHD hücreleri, tümör içeren siroz grubunda sadece iki olguda pozitif olarak bulundu (Resim 3). BHD varlığı ile PCNA indeksi arasında korelasyon saptanmadı.

TARTIŞMA

PCNA ekspresyonu çeşitli dokulardaki normal, neoplastik ve displastik lezyonlarda araştırılmıştır. Mide kansinomunun prekürsör lezyonlarında, PCNA indeksi hiperplastik veya normal glandlara oranla daha yüksek bulunmuştur⁽⁷⁾. Mesanenin ve serviksin displastik lezyonlarında da PCNA ile yaygın pozitiflik gösterilmiştir^(8,9). PCNA (özellikle PC10 klonu) karaciğer patolojisinde yaygın olarak kullanılmış ve kendini kanıtlamış bir proliferasyon belirleyicisidir⁽¹⁰⁻¹³⁾. BHD'yi konu alan çalışmalarda PCNA ile araştırılan hepatosellüler proliferatif aktivite ile ilgili çelişkili sonuçlar vardır. Ballardini ve ark⁽¹⁰⁾, BHD içeren karaciğer biyopsilerinde yüksek proliferatif aktivite saptamış ve hem neoplastik hem de non-neoplastik hepatositlerde PCNA pozitif nükleuslar saptamışken diğer araştırmacılar BHD'nin düşük proliferatif aktivite ile birlikte olduğunu bildirmişlerdir.⁽¹¹⁻¹³⁾ BHD alanları Le Bail ve arkadaşlarının⁽¹²⁾ çalışmasında bir vaka dışında genel olarak PCNA negatif bulunmuştur. Bizim olgularımızda ise HSK içeren siroz grubundaki iki olguda BHD hücrelerinde PCNA pozitifliği saptanmış, diğer olgular-daki BHD hücrelerinde saptanmamıştır. Ayrıca olgularımızda BHD varlığı ile PCNA indeksi arasında korelasyon gösterilememiştir.

BHD ilk tanımlandığında premalign bir lezyon olduğu öne sürülmüştür⁽¹⁾. Değişik etiyolojilere bağlı siroz, siroz zemininde gelişmiş HSK ve non-sirozik zeminde gelişmiş HSK olgularında BHD görülme sıklığı sırasıyla % 9.6-48, % 22-77 ve % 4.6-40 arasında değişen değerlerde bildirilmektedir^(1,2,6,10,14-17). Sirozdan BHD'ye ve karsinoma giden kronolojik dizilim bazı yazarlar tarafından öne

sürülmüştür⁽¹⁾. Siroz, siroz zemininde gelişmiş HSK ve nonsirozik zeminde gelişmiş HSK olgularında BHD frekansları arasında anlamlı bir farklılık bazı çalışmalarda gösterilememişken, bir çok çalışmada BHD varlığı HSK'lı hastalarda anlamlı şekilde yüksektir^(2,6,10). BHD varlığının yaş, cinsiyet ve sirozun etiolojisinden bağımsız olarak üç ila beş kat yüksek HSK gelişimi riski ile birlikte olduğu vurgulanmaktadır⁽¹⁵⁾.

BHD, HSK'a predispozisyon yaratan bir diğer faktör olan kronik HBV enfeksiyonu ile sık olarak birlikte bulunmaktadır. HBV ile ilişkili kronik karaciger hastalıklarında BHD insidansı non sirotik zeminde ve sirotik zeminde gelişmiş HSK olgularındaki karaciğer dokusunda sırasıyla % 6.9-22.2 ve % 51-64.5, tümör içermeyen sirozda ise % 20.3-36.6 olarak bildirilmektedir^(1,14,16). Siroz ve HSK içermeyen kronik B hepatitlerinde BHD oranı % 20'dir.⁽¹⁸⁾ Bizim serimizde ise KHB grubunda % 20, KHB-S grubunda % 25 ve HSK içeren siroz grubunda % 55 oranında BHD saptanmıştır. BHD için esas diagnostik kabul edilen şiddetli BHD, HSK içeren grupta daha yüksek olmakla birlikte bu istatistiksel bir anlam taşımamaktadır.

Bazı araştırmacılar, HBV enfeksiyonunun siroz ve HSK'a oranla BHD gelişiminde daha güçlü bir ilişkisi olduğunu vurgularken, BHD ve viral etiyoloji arasında bir ilişki gösterilemeyen yayınlar da bulunmaktadır^(15,16).

BHD'nin preneoplastik natürü konusunda çelişkili veri ve görüşler bulunmaktadır. Morfometrik ve karyometrik incelemelerde BHD'nin nükleus/ sitoplazma, nükleolus/ sitoplazma oranları normal, rejeneratif ve HbsAg pozitif hücrelerin oranlarından daha yüksektir. BHD hücreleri bu açıdan normal ve neoplastik hepatositler arasında bir yerde bulunmaktadır. Nükleolar ve nükleer oran açısından HSK hücreleri ile arasında çarpıcı bir benzerlik gösterilmiştir⁽⁴⁾. Watanabe ve arkadaşları ise⁽²⁾, BHD hücrelerinin sitoplazma, nükleus ve nükleoluslarının normal hepatositler ile küçük hücreli hepatosellüler displazi ve HSK hücrelerine oranla daha büyük olmasına rağmen N/S oranının normal olduğunu bildirmektedir. Elektron mikroskopik incelemeler ise BHD hücrelerinin dejeneratif değil rejeneratif hücre özellikleri gösterdiğini ortaya koymuştur⁽²⁾.

BHD ve HSK'nin nükleer atipi özellikleri arasında kalitatif bir farklılığın varlığı, BHD hücrelerinin enzim aktivitesinin HSK hücrelerinden farklı oluşu, bcl-2 proteini ve p53 proteininin immünohistokimyasal ekspresyonu

HSK'da izlenirken BHD hücrelerin de çok düşük oranda pozitif ya da negatif olması BHD'nin prekanseröz olmadığını destekleyen verilerdir (19-21)

DNA içeriğini araştırarak çalışmaların sonuçları BHD'nin heterojen bir lezyon ve anöploid subpopulasyon taşıyan bir morfolojik antite olduğunu, bu nedenle de HSK gelişiminde bir prekürsör olabileceğini ima etmektedir (22,23). DNA içeriği çalışmaları daha çok nükleer ploidiyi yansıttığı ve hücresel ploidi hakkında bilgi vermediği için bu veriler BHD'nin prekanseröz niteliğini kanıtlamak konusunda yetersiz kabul edilmektedir (13). Bugüne dek biriken veriler ve bilgiler BHD'nin HSK ile aynı karaciğerde birlikte bulunan fakat HSK gelişim sürecine bir katkısı olmayan bir lezyon olduğunu ima etmektedir ve bu görüş son yıllarda genel bir kabul görmüştür (3,13,24). BHD'nin kronik hepatosit hasarı ve düzensiz hepatosit rejenerasyonu sonucu ortaya çıkan dejenereatif veya anormal ya da değişmiş bir hepatosit rejenerasyonu olabileceği vurgulanmaktadır (2,12). Bir diğer patogenetik model de kronik karaciğer hastalıklarında sürekli hepatosellüler hasar ve rejenerasyon sonucu bir grup hepatositin terminal diferansiasyon ve poliploidizasyona uğraması ve bu hücrelerde hücre bölünmesinin programlanmış mekanizmalarının bozulması sonucu BHD için tipik olan nükleer değişiklikleri gösteren bir hücre grubuna dönüşmesidir. Terminal diferansiasyona giden bu hücrelerde proliferasyon potansiyelinin düşük olması nedeniyle HSK'a ilerleme kapasitelerinin düşük olduğu kabul edilmektedir (13).

Çalışmamız, HBV ile ilişkili kronik karaciğer hastalıklarında HSK içeren olgularda BHD varlığının yüksek olduğunu fakat bunun anlamlı olmadığını, BHD varlığının yaş ile ilişkisi olmadığını ve BHD hücrelerinin düşük proliferatif aktivite ile birlikte olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak BHD hücrelerinin kronik HBV enfeksiyonu ile değişikliğe uğramış, düşük proliferatif aktivite gösteren ve HSK prekürsörü olma olasılığı zayıf olan bir hücre grubu olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Anthony PP, Vogel CL, Barker LF: Liver cell dysplasia: a premalignant condition. *J Clin Pathol* 1973; 26: 217-223.
2. Watanabe S, Okita K, Harada T, Kodama T, ve ark. Morphologic studies of liver cell dysplasia. *Cancer* 1983; 51: 1535-1538.
3. International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology* 1995;22:983-993.
4. Roncalli M, Borzio M, Tombesi MV, Ferrari A, Servida E. A morphometric study of liver cell dysplasia. *Hum Pathol* 1988;19: 471-474.
5. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, ve ark. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162:285-294.
6. Cohen C, Berson SD. Liver cell dysplasia in normal, cirrhotic and hepatocellular carcinoma patients. *Cancer* 1986; 57:1535-1538.
7. Filipe MI, Mendes R, Lane DP, Morris RW. Assessment of proliferating cell nuclear antigen expression in precursor stages of gastric carcinoma using the PC10 antibody to PCNA. *Histopathol* 1993; 22:349-354.
8. Kneuchel R, Burgau M, Rueschoff J, Hofstaedter F. Proliferating cell nuclear antigen in normal urothelium and urothelial lesions of the urinary bladder: a quantitative assessment using a true color image analysis system. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1993; 64:137-144.
9. Mittal KR, Demopoulos RI, Goswami S. Proliferating Cell Nuclear Antigen (Cyclin) Expression Normal and Abnormal Cervical squamous Epithelia. *Am J Surg Pathol* 1993;17 (2): 117-122.
10. Ballardini G, Groff P, Zoli M, Bianchi G, Giostra F, Francesconi R ve ark. Increased risk of hepatocellular carcinoma development in patients with cirrhosis and with high hepatocellular proliferation. *J Hepatol* 1994;20:218-222.
11. Zhao M, Zahg NX, Du ZY, Laissue JA, Zimmermann A. Three types of liver cell dysplasia (LCD) in small cirrhotic nodules are distinguishable by karyometry and PCNA labelling, and their features resemble distinct grades of hepatocellular carcinoma. *Histol Histopathol* 1994; 9: 73-83.
12. Le Bail B, Belleanne G, Bernard P, Saric J, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Adenomatous hyperplasia in cirrhotic livers: Histological evaluation, cellular density, and proliferative activity of 35 macronodular lesions in the cirrhotic explants of 10 adult French patients. *Hum Pathol* 1995; 26:897-906.
13. Lee RG, Tsamandas A, Demetris AJ. Large cell change (liver cell dysplasia) and hepatocellular carcinoma in cirrhosis: Matched case-control study, pathological analysis, and pathogenetic hypothesis. *Hepatology* 1997; 26: 1415-1422.
14. Cohen C, Berson SD, Geddes EW. Liver cell dysplasia: association with hepatocellular carcinoma, cirrhosis and hepatitis B antigen carrier status. *Cancer* 1979; 44: 1671-1676.
15. Ganne-Carrie N, Chastang C, Chapel F, Munz C, Pateron D, Sibony M, ve ark. Predictive score for the development of hepatocellular carcinoma and additional value of liver large cell dysplasia in western patients with cirrhosis. *Hepatology* 1996; 23: 1112-1118.
16. Akagi G, Furuya K, Kanamura T, Chihara H, ve ark. Liver cell dysplasia and hepatitis b surface antigen in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1984;54: 315-318.
17. Roncalli M, Borzio M, De Biag G, Servida E, Cantaboni A, Sironi M, ve ark. Liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma: a histological and immunohistochemical study. *Histopathol* 1985 9,9: 209-221.
18. Karhunen PJ, Penttilä A. Preneoplastic lesions of the human liver. *Hepatogastroenterology* 1987;340: 10-15.
19. Henmi A, Uchida T, Shikata T: Karyometric analysis of liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma. Evidence against the precancerous nature of liver cell dysplasia. *Cancer* 1985; 55: 2594-2599.
20. Zhao M, Zhang NX, Economou M, Blaha I, Laissue JA, Zimmermann A. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in liver lesions: bcl-2 protein is expressed in hepatocellular carcinomas but not in liver cell dysplasia. *Histopathol* 1994; 25: 237-245.
21. Zhao M, Zhang NX, Laissue JA, Zimmermann A. Immunohistochemical analysis of p53 protein overexpression in liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch* 1994; 424: 613-621.
22. An CT, Petrovic LM, Reyter I, Tolmachoff T, Ferrell L, Thung SN. The application of image analysis and neural network technology to the study of large-cell liver-cell dysplasia and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;26: 1224-1231.
23. Roncalli M, Borzio M, Brando B, Colloredo G, Servida A. Abnormal DNA content in liver-cell dysplasia: A flow cytometric study. *Ant J Cancer* 1989; 44: 204-207.
24. Hytiroglu P, Theise ND. Differential diagnosis of hepatocellular nodular lesions. *Sem Diagn Pathol* 1998; 15 (4): 285-299.