

*Yrd. Doç. Dr. Yasemin KAYA¹,
Yrd. Doç. Dr. Ebru ÇANAĞCI²,
Uzm. Dr. Berna BOTAN YILDIRIM³,
Yrd. Doç. Dr. Ahmet KARATAŞ¹,
Doç. Dr. Özgür ENGİNYURT¹,
Yrd. Doç. Dr. Harun DÜĞEROĞLU¹,
Yrd. Doç. Dr. Hilal ALTAŞ⁴*

¹ Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AB

² Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon AB

³ Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AB

⁴ Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği AB.

⁵ Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji AB

Yazışma Adresleri /Address for Correspondence:

Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AB 52000, Ordu, Türkiye

Tel/phone: +90 452 225 23 42

E-mail: ysmnkmz@gmail.com

Anahtar Kelimeler:

Toplum kökenli pnömoni, ürik asit, oksidatif stres

Keywords:

Community-acquired pneumonia, uric acid, oxidative stress

Geliş Tarihi - Received
02/03/2017

Kabul Tarihi - Accepted
13/04/2017

Toplum Kökenli Pnömonili Hastalarda Ürik Asit Düzeyi ile Hastanede Yatış Süresi ve Mortalite Arasındaki İlişki

The Relationship Between Uric Acid Level And Duration of Hospitalization, Mortality In Patients With Community-Acquired Pneumonia

Öz

Amaç: Toplum kökenli pnömoni tanısı ile hastanede yatan hastalarda ürik asit düzeyi ile hastanede yatış süresi ve mortalite arasında ilişki olup olmadığını göstermeyi amaçladık.

Materyal Metod: Toplum kökenli pnömoni tanısı ile serviste ve yoğun bakımda takip edilen 82 hastanın verileri retrospektif olarak tarandı. Hastane kökenli pnömoni, ventilatör bağımlı pnömoni, eşlik eden akut koroner sendrom, malignensi, serebro vasküler hastalık tanısı olanlar ve ikinci bir enfeksiyon odağı olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Hastaların yaş, cinsiyet, yatış süreleri, exitus olup olmadıkları, hemogram ve biyokimyasal parametreleri kaydedildi.

Bulgular: Çalışmamıza alınan 82 hastanın yaş ortalamasını 70.57±11.32 yıl, ortalama hastanede yatış süresini 10.98±9.44 gün, ortalama ürik asit düzeyini 6.74±5.54 mg/dl olarak bulduk. Hastaların % 65.9 ü erkek (n=54), % 34.1i kadın (n= 28) idi. Takip ettiğimiz hastalardaki mortalite oranı ise % 9.8 idi. Çalışmaya dahil edilen hastalardan exitus olanlar ile şifa ile taburcu olanlar karşılaştırıldığında exitus olan grupta yaş ortalaması daha yüksek, ortalama hemoglobin ve ürik asit düzeyi anlamlı olarak daha düşük bulundu (sırasıyla p= 0.4, p=0.4, p=000). Yatış süresinin medianı 9 olarak hesaplandı. Dokuz günden az ve fazla yatan hastalar karşılaştırıldığında hemogram ve biyokimyasal parametreler açısından gruplar arasında bir fark bulunmadı.

Sonuç: Toplum kökenli pnömoni tanısı ile takip edilen hastalarda serum ürik asit düzeyi mortaliteyi öngörmeye klinik bir belirteç olarak kullanılabilir.

Abstract

Objective: We aimed to show whether there is a relationship between uric acid level and hospitalization time, mortality in hospitalized patients with community-acquired pneumonia.

Material Method: Eighty-two patients who were followed in service and intensive care unit with community-acquired pneumonia were retrospectively screened. Pati-

ents with hospital-acquired pneumonia, ventilator-dependent pneumonia, co-morbid diseases such as acute coronary syndrome, malignancy, cerebrovascular disease and another infection centers were excluded. The age, gender, duration of hospital stay, whether they died or not, hemogram and biochemical parameters were recorded.

Results: Eighty-two patients were included from the study. Average age of patients was 70.57 ± 11.32 years, mean hospital stay was 10.98 ± 9.44 days, mean uric acid level was 6.74 ± 5.54 mg/dl. 65.9% of the patients were male (n = 54) and 34.1% were female (n = 28). The mortality rate in the patients was 9.8 %. When the patients with exitus were compared with patients who were discharged, the mean age was higher and mean hemoglobin and mean uric acid levels were significantly lower in exitus group (respectively; $p=0.4$, $p=0.4$, $p=0.000$). The median of the length of stay was calculated as 9. When hospitalized patients with fewer than nine days and with more than nine days were compared, no difference was found between the groups in terms of hemogram and biochemical parameters.

Conclusion: Serum uric acid levels can be used as a clinical marker in predicting mortality in patients with community-acquired pneumonia.

Giriş

Toplum kökenli pnömoni sık görülen, yüksek tedavi maliyetleri olan, önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Ülkemizde yapılan çalışmalara göre pnömoni mortalitesinin % 1-60 arasında olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hastaneye yatırılarak tedavi edilen hastalarda mortalitenin daha da yüksek olduğu bu çalışmalar sonucunda bildirilmiştir. İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri'nde ölüm nedenleri arasında 6. Sırada, ülkemizde ise hastanede gerçekleşen ölümlerinin beşinci nedenidir (1,2).

Ürik asit insanlarda pürin katabolizmasının son ürünüdür. Pürin nükleotidlerinin katabolizması; 5 nükleotidaz etkisiyle fosfat grubunun ayrılmasıyla başlar, pürin nükleozid fosforilaz etkisiyle sürdürülür, son olarak ksantin oksidaz etkisiyle ürik asit oluşur. Bu yıkım süreci başlıca karaciğerde gerçekleşir (3).

Hastalıkların ortaya çıkmasında ve hastalığın ilerlemesinde serbest radikallerin yol açtığı oksidatif stres önemli rol oynamaktadır (4). Hücrede reaktif oksijen radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir (5). Vücutta serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için pek çok anti-oksidan bulunmaktadır. Ürik asit de oksidatif strese karşı koruyucu endojen antioksidanlardan biridir (1,5). Yapılan çalışmalar sonucunda ürik asitin kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek yetmezliği, metabolik sendrom, diabetes mellitus, hipertansiyon, serebral enfarkt gibi hastalıklarda bağımsız bir prognostik belirteç olduğu gösterilmiştir (3,6). Bu klinik durumlarda ürik asitin artış nedeni tam belirlenmemiş olmakla beraber, ürik asitin ok-

sidatif stres, enflamatuvar ve diğer patogenetik mekanizmalar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (3).

Bu çalışmada ürik asidin toplum tokenli pnömoni tanısı ile hastaneye yatırılan hastalarda yatış süresi ve mortalite üzerine predikte ettirici etkisinin araştırılması amaçlandı.

Materyal Metod

Ordu Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan etik kurallara uygunluk izni alındıktan sonra, Sağlık Bakanlığı-Ordu Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi genel yoğun bakım ünitesine, iç hastalıkları ve göğüs hastalıkları bölümüne yatmış olup toplum kökenli pnömoni tanısı alan 82 hastanın verileri retrospektif olarak tarandı. Hastane kökenli pnömoni, ventilatör bağımlı pnömoni, eşlik eden akut koroner sendrom, malignensi, serebro vasküler hastalık tanısı olanlar ve ikinci bir enfeksiyon odağı olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Demografik özellikleri (yaş, cinsiyet) kaydedildi. Hastanede yatış süreleri, exitus olup olmadıkları bilgilerine ulaşıldı Hasta dosyalarından hemogram ve biyokimyasal parametreleri kaydedildi.

İstatistik Analiz: Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) programı kullanıldı. Çalışma verileri tanımlayıcı istatistiksel metodlar olan ortalama, standart sapma, yüzde hesabı ve median kullanılarak değerlendirildi. Grupların karşılaştırılmasında Student T testi kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

Bulgular

Çalışmamıza alınan 82 hastanın yaş ortalamasını 70.57 ± 11.32 yıl, ortalama hastanede yatış süresini 10.98 ± 9.44 gün, ortalama ürik asit düzeyini 6.74 ± 5.54 mg/dl olarak bulduk. Hastaların % 65.9 ü erkek (n=54), % 34.1 sı kadın (n=28) idi. Takip ettiğimiz hastalardaki mortalite oranı ise % 9.8 idi. Serviste takip ettiğimiz hastalarda hiç exitus yokken yoğun bakım ünitesinde takip edilenlerde mortalite oranını %34.7 olarak bulduk. (tablo 1).

Çalışmaya dahil edilen hastalardan exitus olanlar ile şifa ile taburcu olanlar karşılaştırıldığında exitus olan grupta yaş ortalaması daha yüksek, ortalama hemoglobin ve ürik asit düzeyi anlamlı olarak daha düşük bulundu (sırasıyla $p=0.4$, $p=0.4$, $p=0.000$). Diğer hemogram ve biyokimyasal parametreler arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 2).

Yatış süresinin medianı 9 olarak bulundu. Dokuz günden az ve fazla yatan hastalar karşılaştırıldığında hemogram ve biyokimyasal parametreler açısından gruplar arasında bir fark bulunamadı (tablo 3).

Tartışma

Çalışmamızın sonucuna göre toplum kökenli pnömoni-den hastaneye yatırılan hastaların yatış süresi ile ürik asit arasında anlamlı ilişki olmadığı, exitus olan hastalarda ürik

Tablo 1. Toplum kökenli pnömoni tanısı ile takip edilen hastaların hemogram ve biyokimyasal parametreleri

	ortalama±SD
Yaş (yıl)	70.57±11.32
Hemoglobin(g/dl)	11.93±2.03
Beyaz küre(x10.e3/uL)	13.85±7.18
RDW(%)	16.35±2.80
NLO	10.05±8.60
Kan Şekeri (mg/dl)	141.95±57.92
Kreatinin(mg/dL)	1.33±2.18
BUN(mg/dL)	27.58±24.04
ALT (U/L)	23.07±23.71
AST(U/L)	29.22±35.14
CRP (mg/dL)	13.87±9.68
Ürik asit (mg/dl)	6.74±5.54
Yatış süresi (gün)	10.98±9.44
Mortalite oranı (%)	%9.8
Yoğun bakımda mortalite oranı (%)	% 34.7
Serviste mortalite oranı (%)	%0
Cinsiyet	
Kadın(%)	34.1
Erkek(%)	65.9

NLO: Nötrofil Lenfosit Oranı, BUN: Kan Üre Azotu,
ALT: Alanin aminotrasferaz, AST: Aspartat transaminaz
CRP: C-reaktif protein

asit düzeyinin taburcu olan hastalara göre anlamlı olarak daha düşük olduğunu bulduk. Ayrıca yaş ortalamasının exitus olanlarda daha fazla olduğunu ve hemoglobin düzeyinin de daha düşük olduğunu bulduk. Hastanemizde toplum kökenli pnömoni ile takip edilen hastalarda mortalite oranını %9,8 yoğun bakımda takip edilenlerde mortalite oranını %34,7 olarak hesapladık.

Ülkemizde yapılan çalışmaların sonucuna göre toplum kökenli pnömonilerde hastalığın şiddetine göre mortalite ora-

nı % 5.1 ile % 57.3 arasında değişmektedir (6). Ali Fidan ve ark. nın yaptıkları çalışmada hastanede farklı hastalıklarla yatan hastalar arasında toplum kökenli pnömoni mortalite oranını %8.1 olarak saptamışlardır (7). Bizim çalışmamızda da benzer olarak % 9.8 bulduk. Özellikle yoğun bakımda takip edilen olgularda mortalitenin yüksek olduğu bilinmektedir (8,9,10). Yüz yirmi yedi çalışma ve 33 148 hastayı içeren bir meta analiz sonucuna göre pnömoni ile takip edilen hastalarda mortalitenin %13.7 olduğu bulunmuş ve ayaktan veya serviste yatırılarak tedavi edilenlerde bu oranın %5.1, yoğun bakım gerektiren olgularda ise %36.5 olduğu bildirilmiştir (6). Bizim çalışmamızda da yoğun bakımda takip edilen hastalarda mortalite oranını yüksek olarak bulduk. Ülkemizde yapılan bir çalışmada pnömoniden hastanede ortalama yatış süresi 10-12 gün arasında bulunmuş (11). Bizim çalışmamızda yatış süresini 10.98±9.44 gün olarak bulduk. Daha önce yapılan çalışmalarda hastanede yatış süresini predikte ettirmek amacıyla klinik ve laboratuvar dan oluşan çeşitli parametrelere bakılmış (12). Bizde serum ürik asit düzeyinin hastanede yatış süresini predikte ettirip ettirmediğini araştırmak istedik ve yatış süresi ile anlamlı ilişki bulamadık.

İskemi, hemoraji, travma, entoksikasyonlar,alerjik durumlar,enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO₂), ozon (O₃) ve azot dioksit (NO₂) kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarılar sonucunda mitokondrilerdeki aerobik solunum reaksiyonu etkeleneyeceği için elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları daha fazla olacak reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu daha da artacaktır. Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederek hasar verirler. Serbest radikaller sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar. Serbest radikaller pro-

Tablo2. Exitus olanlar ile şifa ile taburcu olanlar arasında hemogram ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

	Exitus olanlar n=8	Şifa ile taburcu olanlar n=74	p
yaş (yıl)	77.0±8.07	69.87±11.4	0.04
Hemoglobin(g/dl)	10.66±1.45	12.05±2.05	0.04
Beyaz küre(x10.e3/uL)	13.76±7.5	13.8±7.2	0.97
RDW(%)	16.1±2.8	16.3±2.8	0.82
NLO	17.87±11.32	9.37±8.07	0.12
Kan Şekeri(mg/dl)	168.25±58.51	140.16±57.94	0.41
Kreatinin(mg/dL)	5.17±7.25	1.01±0.43	0.26
BUN(mg/dL)	32.93±31.75	27.12±23.57	0.70
ALT(U/L)	31.20±40.82	22.37±22.09	0.65
AST(U/L)	39.8±47.72	28.31±34.21	0.62
CRP (mg/dL)	16.72±14.73	13.6±9.28	0.66
Ürik asit(mg/dl)	3.01±1.07	7.05±5.67	0.000

NLO: Nötrofil Lenfosit Oranı, BUN: Kan Üre Azotu, ALT: Alanin aminotrasferaz, AST: Aspartat transaminaz CRP: C-reaktif protein

Tablo 3. 9 günden az ve fazla yatan hastalar arasında hemogram ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

	9 günden az yatış süresi	9 günden fazla yatış süresi	p
Yaş (yıl)	67.60±11.18	72.07±11.94	0.10
Hemoglobin(g/dl)	11.81±2.12	11.77±1.95	0.93
Beyaz küre (x10.e3/uL)	13.60±7.65	14.74±7.22	0.54
RDW(%)	16.51±2.52	16.64±3.06	0.85
NLO	8.05±6.45	11.47±9.28	0.08
Kan şekeri(mg/dL)	154.88±78.20	135.0±36.87	0.24
Kreatinin(mg/dL)	0.98±0.50	1.69±3.03	0.20
BUN(mg/dL)	20.85±11.79	33.80±30.6	0.03
ALT(U/L)	21.22±13.33	25.84±30.77	0.44
AST(U/L)	23.03±12.31	35.59±47.39	0.15
CRP(mg/dL)	12.25±9.39	15.42±9.84	0.22
Ürik asit(mg/dL)	5.99±2.71	6.81±7.35	0.57

NLO: Nötrofil Lenfosit Oranı, BUN: Kan Üre Azotu, ALT: Alanin aminotrasferaz, AST: Aspartat transaminaz, CRP: C-reaktif protein

teinlerde dekarboksilasyona, peptit bağlarının hidrolizine, disülfid ve çapraz bağların oluşumuna sebep olur. Bu durumda Ca ATPaz ve Na/K ATP az gibi enzimlerde fonksiyon kaybı yaparak hücre içi ve dışı iyon dağılımlarının bozulmasına, ATP sentezinin azalmasına sebep olurlar. Nükleer ve mitokondriyal DNA yı okside ederek DNA zincirinin kırılmasına yol açarlar. Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı meydana getirir ve hücreyi ölüme götürür (4,5).

Başta enfeksiyon olmak üzere bir çok nedenle artmış olan lökötrienler, prostaglandinler ve platelet activating factör gibi mediatörler nötrofil, monosit ve eozinofilleri aktive ederler. Bu hücreler aktive olunca doku lezyonunun olduğu yerde birikirler ve oksidan moleküller salgırlarlar. Enfeksiyöz ajanlarla savaş için gerekli olan bu oksidan maddeler aşırı salgılanacak olursa bu sefer vücuttaki dokulara zarar vermeye başlarlar. Bu nedenle oksidan maddelerin normal düzeylerin üstüne çıkmaması gerekir (4).

Ürik asit bir antioksidan türüdür. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda hiperüriseminin pro-inflamatuar mediatörlerin üretimini arttırdığı ve bunun sonucunda sistemik enflamatuar cevabın daha da şiddetlenmesine neden olan endotoksin etkisini arttırdığı ispatlanmıştır (13).

Ciddi enfeksiyon durumunda, birçok organın iskemisi ve hipoksi ürik asit oluşturmak üzere ksantin oksidazi aktive eder (14,15), böylece ürik asit artar. Aynı zamanda şiddetli enfeksiyonlar böbrekten ürik asit atılımını azaltarak kanda birikmesine katkıda bulunur. Pek çok çalışma, serum ürik asit seviyelerinin sepsisin şiddetini ve prognozunu yansıtabileceğini bildirmiştir (16,17,18). Bu çalışmada exitus olan hastalarda serum ürik asit düzeyi daha düşük bulunmuştur. Bu hasta grubunda vücutta antioksidan düzeyinin artmamış olması mevcut enfeksiyona yeterli cevap veremediğini düşündürmektedir. Bunun da mortalite ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç: Antioksidan olarak bilinen ürik asit düzeyinin toplum kökenli pnömonili hastalarda mortaliteyi öngörmeye belirteç olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Bu verinin daha geniş prospektif çalışmalarla araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Gökırmak M., Hasanoğlu H.C., Yıldırım Z., Köksal N., Orhan Z., Hacıevliyagil S.S. Türk Toraks Derneği Pnömoni Rehberi'ne Uygun Tedavi Verilen Ve Verilmeyen Toplum Kökenli Pnömonilerde Başarı Oranları. *Tüberküloz Ve Toraks Dergisi* 2001; 49(3): 297-311
2. Koçyiğit E. *Toplum Kökenli Pnömoni. İç Hastalıkları Dergisi* 2011; 18: 1-11
3. Parmaksız E.T., Salepçi B., Güngör G.A., Cömert S., Parmaksız E. Ürik Asit Obstrüktif Uyku Apne Sendromunda Bir Belirteç Midir? *Do I: 10.4274/Jtsm.228 Journal Of Turkish Sleep Medicine* 2016;3:73-78
4. Yerer M.B., Aydoğan S. *Oksidatif Stres Ve Antioksidanlar. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2000 9(1)49-53
5. Dawn Bm, Allan Dm, Colleen Ms. *Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland. (1996)*
6. Sezgi C., Abakay A., Tanrıku A.Ç., Selimoğlu Şen H., Çalkanat A.İ., Şenyiğit A. *Göğüs Hastalıkları Kliniğinde Mortalite Nedenleri. Selçuk Tıp Derg* 2010;26(2):42-45
7. Fidan A., Kıral N., Erdem İ., Eren A., Saraç G., Çağlayan B. *Toplum Kökenli Pnömonilerde Hastane Mortalitesi Ve Ulusal Pnömoni Tanı Ve Tedavi Rehberine Göre Değerlendirme Türk Toraks Dergisi Ağst 2005, Cilt 6, Sayı 2, Sayfa(Lar) 115-121*
8. *Toraks Derneği Erişkin Ve Çocuklarda Toplum Kökenli Pnömoni Tanı Ve Tedavi Rehberi, 2002. Toraks Dergisi* 2002;3(Ek 3):1-15.
9. Feldman C., Viljoen E., Morar R., Richards G., Sawyer L., Goolam Mahomed A.. *Prognostic Factors İn Severe Commu-*

- nity- Acquired Pneumonia In Patients Without Co-Morbid Illness. *Respirol* 2001;6:323-30
10. Baudouin Sv. *The Pulmonary Physician In Critical Care 3: Critical Care Management Of Community Acquired Pneumonia. Thorax* 2002;57:267-71.
11. Hacievliyagil S.S., Mutlu L.C., Gülbaş G., Yetkin Ö., Günen H. Göğüs Hastalıkları Servisine Yatan Hastaların Hastane Yatış Maliyetlerinin Karşılaştırılması. *Toraks Dergisi* 2006; 7(1): 11-16
12. Suter-Widmer I., Christ-Crain M. , Werner Zimmerli , Albrich W. , Mueller B. and Schuetz P. Predictors for length of hospital stay in patients with community-acquired Pneumonia: Results from a Swiss Multicenter study. *BMC Pulmonary Medicine* 2012, 12:21
13. He-Chen Zhu, Ruo-Lan Cao. The Relationship Between Serum Levels Of Uric Acid And Prognosis Of Infection In Critically Ill Patients . *World J Emerg Med, Vol 3, No 3, 2012*
14. Meneshian A, Bulkley Gb. *The Physiology Of Endothelial Xanthine Oxidase: From Urate Catabolism To Reperfusion Injury To Inflammatory Signal Transduction. Microcirculation* 2002; 9: 161–175.
15. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total Antioxidant Capacity As A Tool To Assess Redox Status: Critical View And Experimental Data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 1106–1114
16. Feig D, Kang D-H, Johnson Rj. Uric Acid And Cardiovascular Risk. *N Engl J Med* 2008; 359: 1811–1821.
17. Fang Z., Zhou L., Bao Y., Ding W., Shi H., Luo X. Et Al. Association Of Nt-Probnp And Multiple Biomarkers With Severity Of Angiographic Coronary Artery Disease In Diabetic And Pre-Diabetic Chinese Patients. *Plos One* 2011; 6: E22563. Epub 2011 Aug 16.
18. Terada Ls, Guidot Dm, Leff Ja, Willingham Ir, Hanley Me, Piermattei D., Et Al. Hypoxia Injures Endothelial Cells By Increasing Endogenous Xanthine Oxidase Activity. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1992; 89: 3362–3366