

<https://doi.org/10.34883/PI.2023.14.4.009>



Пархоменко А.А.¹, Застрожин М.С.^{1,2,3}, Скрыбин В.Ю.^{1,2}, Денисенко Н.П.¹, Акмалова К.А.¹, Иванченко В.А.², Поздняков С.А.², Носков В.В.², Зайцев И.А.², Новиков Е.М.¹, Анисимова А.Н.², Власенко Е.П.², Брюн Е.А.^{1,2}, Сычев Д.А.¹

¹ ФГБОУ ДПО РМАНПО, Москва, Россия

² Московский научно-практический центр наркологии, Москва, Россия

³ Калифорнийский университет, Сан-Франциско, США

Влияние полиморфизма 6986A>G гена CYP3A5 на профиль эффективности и безопасности галоперидола у пациентов с острыми алкогольными галлюцинозами

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Пархоменко А.А., Застрожин М.С., Скрыбин В.Ю. – существенный вклад в замысел и дизайн исследования, статистическая обработка полученных данных; Денисенко Н.П., Акмалова К.А., Иванченко В.А., Поздняков С.А., Носков В.В., Зайцев И.А. – сбор данных, проведение необходимых лабораторных исследований; Новиков Е.М., Анисимова А.Н., Власенко Е.П. – поиск и анализ литературных данных; Брюн Е.А., Сычев Д.А. – редактирование окончательного варианта статьи, окончательное утверждение версии для публикации.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00190, <https://rscf.ru/project/22-15-00190/>.

Подана: 03.07.2023

Принята: 10.10.2023

Контакты: Alexamini@yandex.ru

Резюме

На сегодняшний день в наркологической практике для лечения пациентов с острыми алкогольными галлюцинозами часто используют типичный антипсихотик – галоперидол. Известно, что терапия галоперидолом сопряжена с высоким риском развития нежелательных лекарственных реакций. Есть данные, что ген CYP3A5 может изменять скорость биотрансформации и таким образом влиять на профиль эффективности и безопасности галоперидола.

Цель. Изучение влияния полиморфизма 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746) на показатели эффективности и безопасности галоперидола у пациентов с острыми алкогольными галлюцинозами.

Методы. В данном исследовании принимали участие 100 пациентов мужского пола с острыми алкогольными галлюцинозами (средний возраст 41,4±14,4 года). Профиль эффективности оценивали с помощью валидизированной психометрической шкалы PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale). Профиль безопасности терапии оценивали при помощи международной валидизированной шкалы UKU (Side-Effect Rating Scale) и по шкале SAS (Simpson – Angus Scale for Extrapyramidal Symptoms). Генотипирование проводилось методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР Real-time).

Результаты. По результатам исследования не были получены статистически значимые результаты в показателях оценки эффективности (динамика изменения баллов по шкале PANSS: генотип AA –14,00 [–17,00; –12,00], генотип AG –14,00 [–15,25; –12,00], $p=0,417$). В показателях оценки профиля безопасности терапии галоперидолом

статистически значимой разницы не было выявлено (динамика баллов по шкале UKU: генотип AA 9,00 [7,00; 13,25], генотип AG 9,00 [7,75; 12,25], $p=0,934$; динамика баллов по шкале SAS: генотип AA 12,00 [10,00; 15,00], генотип AG 12,00 [9,75; 17,50], $p=0,863$).

Заключение. Исследование показало, что генотипирование по полиморфизму 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746) у пациентов с острыми алкогольными галлюцинозами не является значимым при подборе дозы галоперидола и показателем профиля безопасности терапии галоперидолом, так как встречаемость немутантного аллеля в популяции пациентов очень мала.

Ключевые слова: CYP3A5, фармакогенетика, персонализированная медицина, острые алкогольные галлюцинозы, галоперидол, нежелательные лекарственные реакции

Parkhomenko A.¹, Zastrozhin M.^{1,2,3}, Scriabin V.^{1,2}, Denisenko N.¹, Akmalova K.¹, Ivanchenko V.², Pozdnyakov S.², Noskov V.², Zaitsev I.², Novikov E.¹, Anisimova A.², Vlasenko E.², Brun E.^{1,2}, Sychev D.¹

¹ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

² Moscow Scientific and Practical Center of Narcology, Moscow, Russia

³ University of California, San Francisco, USA

Effect of Polymorphism 6986A>G of the CYP3A5 Gene on the Efficacy and Safety Profile of Haloperidol in Patients with Acute Delirium Tremens

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Parkhomenko A., Zastrozhin M., Skryabin V. – significant contribution to the conception and design of the study, statistical processing of the obtained data; Denisenko N., Akmalova K., Ivanchenko V., Pozdnyakov S., Noskov V., Zaitsev I. – data collection, conducting the necessary laboratory studies; Novikov E., Anisimova A., Vlasenko E. – search and analysis of literature data; Brun E., Sychev D. – editing of the final version of the article, final approval of the version for publication.

Funding. The research was carried out at the expense of a grant from the Russian Science Foundation № 22-15-00190, <https://rscf.ru/project/22-15-00190/>.

Submitted: 03.07.2023

Accepted: 10.10.2023

Contacts: Alexamini@yandex.ru

Abstract

Today, in drug treatment practice, a typical antipsychotic, haloperidol, is often used to treat patients with acute delirium tremens. Haloperidol therapy is known to be associated with a high risk of adverse drug reactions. There is evidence that the CYP3A5 gene can alter the rate of biotransformation and thus affect the efficacy and safety of haloperidol.

Purpose. To study the effect of polymorphism 6986A>G of the CYP3A5 gene (rs776746) on the efficacy and safety of haloperidol in patients with acute delirium tremens.

Methods. This study involved 100 male patients with acute delirium tremens (average age 41.4 ± 14.4 years). The effectiveness profile was assessed using the validated psychometric PANSS scale (Positive and Negative Syndrome Scale). The safety profile of the therapy

was assessed using the internationally validated UKU scale (Side-Effect Rating Scale) and the SAS scale (Simpson – Angus Scale for Extrapyrarnidal Symptoms). Genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR).

Results. According to the results of the study, no statistically significant results were obtained in performance evaluation indicators (dynamics of changes in scores on the PANSS scale: genotype AA –14.00 [–17.00; –12.00], genotype AG –14.00 [–15.25; –12.00], $p=0.417$). There was no statistically significant difference in the safety profile of haloperidol therapy (UKU score dynamics: AA genotype 9.00 [7.00; 13.25], AG genotype 9.00 [7.75; 12.25], $p=0.934$; SAS score dynamics: AA genotype 12.00 [10.00; 15.00], AG genotype 12.00 [9.75; 17.50], $p=0.863$).

Conclusion. The study showed that genotyping by polymorphism 6986A>G of the CYP3A5 gene (rs776746) in patients with acute delirium tremens is not significant when selecting the dose of haloperidol and an indicator of the safety profile of haloperidol therapy, since the occurrence of the non-mutant allele in the patient population is very small.

Keywords: CYP3A5, pharmacogenetics, personalised medicine, delirium tremens, haloperidol, suspected adverse reaction

■ ВВЕДЕНИЕ

Одним из осложнений хронического злоупотребления алкоголем является острый алкогольный галлюциноз [1]. Встречаемость острых алкогольных галлюцинозов, по данным различных исследований, составляет от 0,4 до 12% [2]. Таким образом, во всем мире алкогольный галлюциноз считается или редким, или недостаточно диагностированным заболеванием [3].

Согласно рекомендациям, для лечения алкогольных психозов применяют галоперидол [4]. Терапия галоперидолом часто сопряжена с развитием нежелательных лекарственных реакций (НЛР), таких как дискинезия, острая дистония, ортостатическая гипотензия [5].

В метаболизме галоперидола задействованы изоферменты CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, полиморфизм которых влияет на биотрансформацию лекарственного средства [5, 6].

Гены CYP3A4 и CYP3A5 располагаются на 7-й хромосоме соседних локусов [7]. CYP3A5 структурно подобен CYP3A4, это приводит к тому, что почти 85% их субстратов являются общими [8]. Изофермент CYP3A5 составляет не менее 50% экспрессируемых изоферментов семейства CYP3A [7, 8]. В отличие от гена CYP3A4, который считается низкополиморфным, ген CYP3A5 является высокополиморфным: изучено до 25 аллельных вариантов CYP3A5 (обозначаются как *1–*9) [7, 9]. У европеоидов часто встречается полиморфный вариант 6986A>G гена CYP3A5*3 (rs776746), который характеризуется сниженной экспрессией фермента [9]. По некоторым данным исследований, от 82 до 95% европеоидов являются носителями CYP3A5*3 или аллеля G данного полиморфизма [9].

Было продемонстрировано, что у пациентов с алкогольной зависимостью, получавших галоперидол, частота встречаемости минорного аллеля по полиморфизму CYP3A5*3 в российской популяции редкая (2,27%) и не оказывает сильного влияния на безопасность ($p=0,64$) лечения галоперидолом, следовательно, нет

оснований учитывать этот полиморфизм [10]. В то же время роль гена CYP3A5 должна быть изучена глубже, так как есть некоторые данные, что CYP3A5 катализирует альтернативные пути метаболизма и таким образом может привести к появлению промежуточных метаболитов, которые могут ограничить биологическую доступность препарата [11]. Генетический полиморфизм CYP3A5 влияет на экспрессию и активность белка, следовательно, изменяет клиренс лекарств, избирательно метаболизируемых CYP3A5 [12–14].

Таким образом, целью данной работы является изучение влияния полиморфизма 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746) на показатели эффективности и безопасности галоперидола у пациентов с острыми алкогольными галлюцинозами.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие 100 пациентов мужского пола (средний возраст – $41,4 \pm 14,4$ года), у которых были диагностированы острые алкогольные галлюцинозы, находившихся на стационарном лечении в Московском научно-практическом центре наркологии Департамента здравоохранения города Москвы. Основное заболевание по МКБ-10 – «Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением алкоголя: преимущественно галлюцинаторное расстройство» (F10.52). Данной группе пациентов с целью терапии острой галлюцинаторной симптоматики в стационаре назначался галоперидол в форме раствора для внутримышечных и внутривенных инъекций в дозировке 5–10 мг/сут. Терапия галоперидолом начиналась с момента поступления пациента в отделение неотложной наркологической помощи ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ» и длилась в течение 5 дней. Помимо галоперидола все пациенты получали минимизированную стандартную терапию в течение 5 дней, которая предусматривала использование инфузионных и ионосодержащих растворов, а также витаминов. Назначение лекарственных средств проводилось в соответствии с Клиническими рекомендациями «Психотические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением психоактивных веществ. Психотическое расстройство» и Стандартом специализированной медицинской помощи при психотическом расстройстве, вызванном употреблением психоактивных веществ.

Критерии включения в исследование: наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании; подтвержденный диагноз по МКБ-10 «Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением алкоголя: психотическое расстройство, преимущественно галлюцинаторное расстройство» (F10.52); пациенты, получающие галоперидол в форме раствора для внутримышечного и внутривенного введения в течение 5 дней (5 периодов полувыведения).

Критерии невключения: клиренс креатинина < 50 мл/мин, концентрация креатинина в плазме крови $\geq 1,5$ мг/дл (133 мкмоль/л); масса тела менее 60 кг или превышающая 100 кг; возраст ≥ 75 лет; применение в терапии иных антипсихотических препаратов помимо галоперидола; пациенты, имеющие хронические психотические расстройства; наличие противопоказаний к применению галоперидола.

На 1-й и 6-й дни пребывания в стационаре после назначения галоперидола производился сбор биоматериала (кровь, моча).

Перед исследованием каждый пациент подписывал информированное согласие на добровольное участие в исследовании (протокол № 14 от 27.10.2020), форма

которого утверждалась локальным этическим комитетом Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России.

Для проведения генотипирования исследовали венозную кровь, собранную на 6-е сутки после начала применения галоперидола в вакуумные пробирки VACUETTE® (Greiner Bio-One, Австрия). Определение генотипа по выбранному полиморфизму 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746) производили с использованием аллельспецифической гибридизации методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (Real-Time PCR).

Оценка эффективности терапии галоперидолом производилась при помощи позитивной субшкалы PANSS [15]. Профиль безопасности терапии галоперидолом оценивался с помощью шкалы оценки побочного действия UKU (UKU Side-Effect Rating Scale) [16] и шкалы Симпсона – Ангуса для оценки экстрапирамидных побочных эффектов (Simpson – Angus Scale for Extrapyramidal Symptoms (SAS)) [17].

Оценку по шкалам и забор биоматериалов проводили в 1-й день начала терапии, включающей галоперидол, и 6-й день лечения.

Статистический анализ осуществлялся с помощью пакета прикладных программ Statsoft Statistica ver. 10.0 (Dell Statistica, Tulsa, OK, USA). Статистический анализ результатов исследования производили методами непараметрической статистики, выбор был обусловлен отсутствием нормального характера распределения данных, проверка которого осуществлялась с помощью W-теста Шапиро – Уилка. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (при статистической мощности свыше 80%). Для сравнения 2 выборок непрерывных независимых данных использовали U-тест Манна – Уитни, зависимых – тест Уилкоксона. В случае множественного сравнения производили коррекцию нарастания ошибки 1-го рода с помощью теста Бенджамина – Хохберга. Данные в работе представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me [Q1; Q3]).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам генотипирования CYP3A5 по полиморфному маркеру 6986A>G (rs776746) у 100 пациентов мужского пола с острыми алкогольными галлюцинозами были получены следующие данные:

- 1) количество пациентов, являющихся гомозиготными носителями полиморфизма 6986A>G гена CYP3A5 (генотипа AA), составило 80 (80%);
- 2) количество пациентов, являющихся гетерозиготными носителями полиморфизма 6986A>G гена CYP3A5 (генотипа AG), составило 20 (20%).

Таким образом, дальнейшее исследование включало сравнение показателей профиля эффективности и безопасности между носителями генотипа (AA) и генотипа (AG) по полиморфизму 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746).

Результаты, полученные при анализе психометрической шкалы PANSS, шкале оценки побочного действия ЛС UKU и шкале оценки экстрапирамидных побочных эффектов ЛС SAS у пациентов, получавших галоперидол, на 1-й и 6-й дни исследования, представлены в таблице.

Динамика изменения баллов по подшкале выраженности позитивной симптоматики PANSS у пациентов с разными генотипами (AA и AG) представлена на рис. 1. Статистический анализ данных профиля эффективности галоперидола с разными генотипами по полиморфному маркеру 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746) показал

Данные психометрической шкалы и шкалы оценки выраженности НЛР на 1-й и 6-й день пребывания в стационаре
Data from the psychometric scale and the ADR severity assessment scale on the 1st and 6th day of hospital stay

Показатель	AA (N=80)	AG (N=20)	p*
1-й день пребывания в стационаре			
PANSS (усл. ед.)	15,00 [13,00; 18,00]	15,00 [13,00; 17,00]	0,425
SAS (усл. ед.)	0 [0; 0]	0 [0; 0]	>0,999
UKU (усл. ед.)	0 [0; 0]	0 [0; 0]	>0,999
6-й день пребывания в стационаре			
PANSS (усл. ед.)	1,00 [1,00; 2,00]	1,00 [1,00; 2,00]	0,541
SAS (усл. ед.)	12,00 [10,00; 15,00]	12,00 [9,75; 17,50]	0,863
UKU (усл. ед.)	9,00 [7,00; 13,25]	9,00 [7,75; 12,25]	0,934

Примечание: p* – p-value по результатам коррекции теста Бенджамина – Хохберга, учитывающего множественный характер сравнения (по результатам U-критерия Манна – Уитни).

отсутствие статистически значимых различий: AA –14,00 [–17,00; –12,00], AG –14,00 [–15,25; –12,00], p=0,417.

На рис. 2, 3 представлена динамика изменения баллов по шкалам SAS и UKU у пациентов с разными генотипами. При проведении статистического анализа данных профиля безопасности галоперидола по шкалам SAS и UKU у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746) не было выявлено наличия статистически значимых различий:

- по шкале SAS: генотип AA 12,00 [10,00; 15,00], генотип AG 12,00 [9,75; 17,50], p=0,863;
- по шкале UKU: генотип AA 9,00 [7,00; 13,25], генотип AG 9,00 [7,75; 12,25], p=0,934.

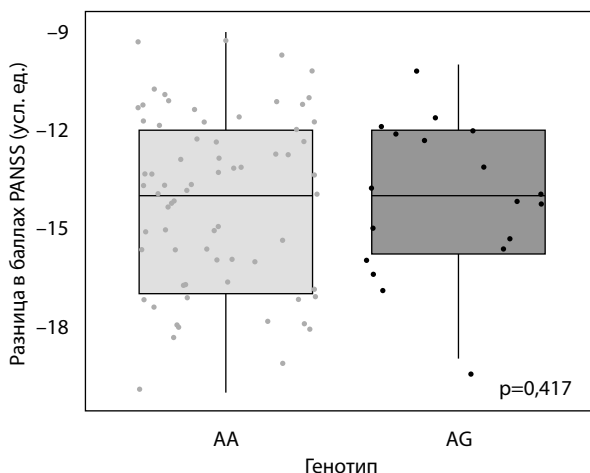


Рис. 1. Динамика изменения количества баллов по подшкале выраженности позитивной симптоматики PANSS с 1-го по 6-й день пребывания в стационаре у пациентов с разными генотипами (AA и AG) по полиморфному маркеру 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746)
Fig. 1. Dynamics of changes in the number of points on the subscale of the severity of positive symptoms of PANSS from the 1st to the 6th day of hospital stay in patients with different genotypes (AA and AG) according to polymorphic marker 6986A>G of the CYP3A5 gene (rs776746)

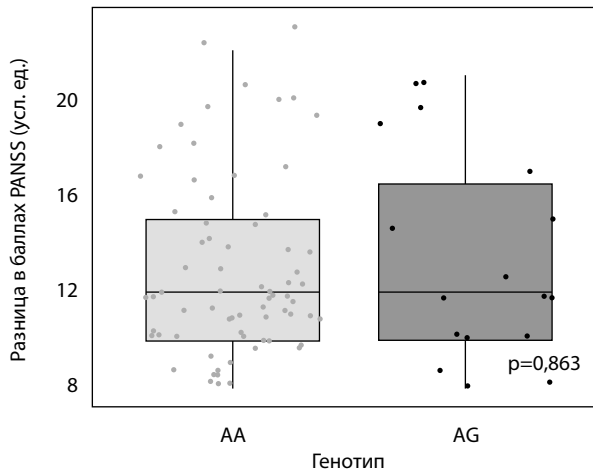


Рис. 2. Динамика изменения количества баллов по шкале SAS с 1-го по 6-й день пребывания в стационаре у пациентов с разными генотипами (AA и AG) по полиморфному маркеру 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746)

Fig. 2. Dynamics of changes in the number of SAS scores from the 1st to the 6th day of hospital stay in patients with different genotypes (AA and AG) according to polymorphic marker 6986A>G of the CYP3A5 gene (rs776746)

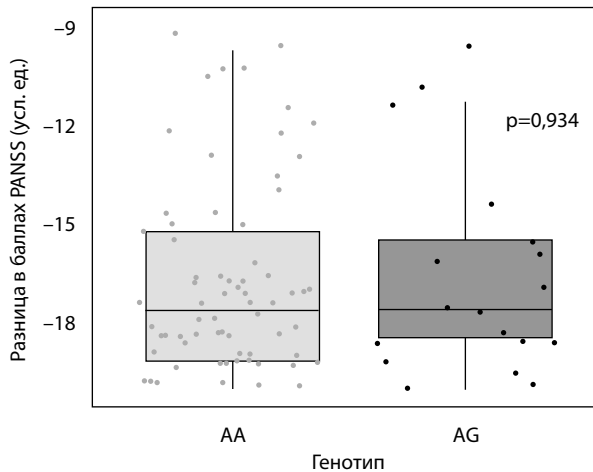


Рис. 3. Динамика изменения количества баллов по шкале UKU с 1-го по 6-й день пребывания в стационаре у пациентов с разными генотипами (AA и AG) по полиморфному маркеру 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746)

Fig. 3. Dynamics of changes in the number of points on the UKU scale from the 1st to the 6th day of hospital stay in patients with different genotypes (AA and AG) according to polymorphic marker 6986A>G of the CYP3A5 gene (rs776746)

■ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования не было выявлено статистически значимых различий в показателях эффективности и безопасности терапии галоперидолом у пациентов с острыми алкогольными галлюцинозами, являющихся носителями разных

генотипов по полиморфному маркеру 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746). Можно сделать вывод, что проведение генотипирования по полиморфизму 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746) не является значимым при подборе дозы галоперидола у пациентов с острыми алкогольными галлюцинозами вследствие редкой встречаемости носителей генотипа AG.

Результаты нашего исследования совпадают с данными предыдущего исследования, демонстрирующего, что частота встречаемости минорного аллеля по полиморфизму CYP3A5*3 в российской популяции редкая и не оказывает значимого влияния на безопасность лечения галоперидолом [10]. Так, можно сделать вывод, что нет оснований учитывать полиморфизм 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746) у пациентов с острыми алкогольными галлюцинозами, получающих галоперидол.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным исследования, у 100 пациентов с острыми алкогольными галлюцинозами было показано, что полиморфизм 6986A>G гена CYP3A5 (rs776746) не влияет на профиль эффективности и безопасности терапии галоперидолом.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Perme B, Vijaysagar KJ, Chandrasekharan R. Follow-up study of alcoholic hallucinosis. *Indian J Psychiatry*. 2003;45:244–246.
2. Jordaan GP, Emsley R. Alcohol-induced psychotic disorder: A review. *Metab Brain Dis*. 2014;29(2):231–243. doi: 10.1007/s11011-013-9457-4
3. Narasimha VL, Patley R, Shukla L, Benegal V, Kandasamy A. Phenomenology and Course of Alcoholic Hallucinos. *J Dual Diagn*. 2019;15(3):172–176. doi: 10.1080/15504263.2019.1619008
4. Stewart S, Swain S; NICE; Royal College of Physicians, London. Assessment and management of alcohol dependence and withdrawal in the acute hospital: concise guidance. *Clin Med (Lond)*. 2012;12(3):266–271.
5. Fang J, McKay G, Song J, Remilrd A, Li X, Midha K. In vitro characterization of the metabolism of haloperidol using recombinant cytochrome p450 enzymes and human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(12):1638–1643.
6. Parkhomenko AA, Zastrozhin MS, Skryabin V, Ivanchenko VA, Pozdniakov SA, Noskov VV, Zaytsev IA, Denisenko NP, Akmalova KA, Bryun EA, Sychev DA. Correlation of 1846G>A Polymorphism of CYP2D6 Gene with Haloperidol Efficacy and Safety in Patients with Alcoholic Hallucinoses. *Psychopharmacol Bull*. 2022 Jun 27;52(3):58–67. PMID: 35815171. PMCID: PMC9235315
7. De Jonge H, Elens L, de Loo H, et al. The CYP3A4*22 C>T single nucleotide polymorphism is associated with reduced midazolam and tacrolimus clearance in stable renal allograft recipients. *Pharmacogenomics J*. 2015;15(2):144–152. doi: 10.1038/tpj.2014.49
8. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001;4(27):383–391. doi: 10.1038/86882
9. Werk AN, Cascorbi I. Functional gene variants of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*. 2014;96(3):340–348. doi: 10.1038/clpt.2014.129
10. Zastrozhin MS, Grishina EA, Ryzhikova KA, Smirnov VV, Savchenko LM, Bryun EA, Sychev DA. The influence of CYP3A5 polymorphisms on haloperidol treatment in patients with alcohol addiction. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2017 Dec 28;11:1–5. doi: 10.2147/PGPM.S144503. PMID: 29343979. PMCID: PMC5749387
11. Ragia G, Dahl ML, Manolopoulos VG. Influence of CYP3A5 polymorphism on the pharmacokinetics of psychiatric drugs. *Curr Drug Metab*. 2016;17(3):227–36. doi: 10.2174/1389200217666151210125831. PMID: 26651976
12. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001;27:383–391.
13. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54:1271–1294.
14. Xie HGWA, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics*. 2004;5:243–272.
15. Kay S.R, Fiszbein A, Opler L.A. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1987;13(2):261–76. doi:10.1093/schbul/13.2.261
16. Lingjaerde O., Ahlfors U.G., Bech P., et al. The UKU side effect rating scale. A new comprehensive rating scale for psychotropic drugs and a cross-sectional study of side effects in neuroleptic-treated patients. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1987;334:1–100. doi: 10.1111/j.1600-0447.1987.tb10566
17. Simpson G.M., Angus J.W.S. A rating scale for extrapyramidal side effects. *Acta Psychiatr Scand*. 1970;212:11–19. doi: 10.1111/j.1600-0447.1970.tb02066.x