

Проспективное рандомизированное двойное слепое исследование, сравнивающее эффективность и безопасность ботулинического токсина типа А Botox и Prosigne при лечении цервикальной дистонии

Элизабет Мария Апаресида Барашневичус Квальято, доктор медицинских наук, Эдмур Франко Карелли, доктор медицинских наук, доктор философии, и Маура Апаресида Виана, доктор медицинских наук

Резюме: Ботулотоксин А (БТА) считается эффективным средством лечения цервикальной дистонии. Целью данного проспективного рандомизированного двойного слепого исследования было сравнение Botox и Prosigne, препаратов на основе ботулинического токсина китайского происхождения, с целью установления безопасности, эффективности и эквивалентности доз двух препаратов при лечении цервикальной дистонии. Двадцать четыре пациента были случайным образом распределены в группы, получавшие 300 ЕД Botox или Prosigne (по 12 пациентов в каждой группе). Состояние пациентов оценивали до инъекции, а также через 4 и 16 недель после инъекции с помощью Торонтской западной шкалы оценки спастической кривошеи и краткой формы опросника качества жизни 36 (Short-Form 36). Все пациенты были сопоставимы по возрасту, времени, прошедшему с начала заболевания, количеству предыдущих инъекций и времени, прошедшему с момента последнего применения ботулинического токсина типа А. Согласно оценкам по Торонтской западной шкале оценки спастической кривошеи, состояние пациентов улучшилось после инъекции, и показатели повысились через 16 недель, не вернувшись к исходным значениям. Как боль и жжение во время инъекции, так и результаты лечения были схожими в обеих группах. Системных нежелательных явлений не наблюдалось, а тяжесть и частота местных проявлений были сопоставимы в обеих группах. Средняя продолжительность эффекта была одинаковой в обеих группах (11 недель). Показатели качества жизни до и после инъекций были сопоставимы в обеих группах. Социальные аспекты, болевые ощущения и жизненная энергия улучшились через 16 недель в обеих группах. В заключение, было установлено, что Botox и Prosigne обладают эквивалентной эффективностью, безопасностью и переносимостью, а эквивалентность доз для лечения цервикальной дистонии составляет 1:1.

Ключевые слова: цервикальная дистония, ботулинический токсин типа А, рандомизированное клиническое исследование (Clin Neuropharm 2010;33: 22Y26)

Цервикальная дистония (ЦД) — наиболее распространенная форма очаговой дистонии, характеризующаяся непроизвольным сокращением шейных мышц, приводящим к болезненным и изнуряющим спазмам и нарушению осанки шейного отдела позвоночника.¹ Распространенность заболевания составляет 8,9 случаев на 100 000 жителей.² О его физиопатологии известно немного, но считается, что оно обусловлено нейрофизиологическими изменениями в базальных ганглиях и стволе головного мозга.³

Клинически цервикальная дистония проявляется в виде поворота (кривошея), бокового наклона (латероколлиз), переднего сгибания (антероколлиз) или разгибания (ретроколлиз) головы, что может привести к различным позам и/или движениям головы, которые могут

встречаться изолированно или в различных комбинациях.⁴ За исключением случаев допа-зависимых дистоний, ни одно системное лекарственное или хирургическое лечение не обеспечивает одинаково удовлетворительных результатов. Ботулотоксин А — это мощное нервно-мышечное парализующее средство, вызывающее временную функциональную денервацию и атрофию мышц, в которые была сделана инъекция. Этот метод считается высокоэффективным терапевтическим вариантом и общепринятым методом лечения очаговых дистоний.^{4Y6}

Из приблизительно 80 исследований ботулинического токсина в лечении ЦД 14 являются контролируемыми исследованиями. Среди них 7 относятся к исследованиям 1-го класса, в 4 из которых использовался ботулинический токсин А, а в 3 — ботулинический токсин В, и их результаты подтвердили, что ботулинические токсины А и В безопасны и эффективны для лечения ЦД. В этих исследованиях максимальный эффект наблюдался через 6 недель после инъекции, с улучшением функциональных возможностей, способности поворачивать голову, уменьшением боли и улучшением субъективной оценки. К нежелательным явлениям относились дисфагия, слабость в области шеи, изменения голоса и усталость.⁶ В этих 7 исследованиях 1-го класса, в которых лечили 584 пациента с ЦД, для оценки эффективности ботулинического токсина использовались Торонтская западная шкала оценки спастической кривошеи (TWSTRS) и шкала Цуи.^{6,7}

Лечение цервикальной дистонии с помощью ботулинического токсина типа А значительно улучшает эмоциональный, социальный и болевой аспекты оценки качества жизни. Лечение ботулотоксином А увеличивает стоимость лечения ЦД, но улучшает качество жизни, снижая боль, а также улучшая социальные и психологические функции у пациентов со спастической кривошеей.⁸

Препарат ботулинического токсина А был представлен в Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США в 1979 году и с тех пор назначается для лечения ряда клинических заболеваний. Botox, препарат на основе ботулинического токсина типа А (БТА) североамериканского происхождения (Allergan, Irvine, Калифорния), используется в Бразилии с 1991 года. Препарат Prosigne, производимый с 1988 года Ланчжоуским институтом биологических продуктов, был одобрен для коммерческого использования в Китае в 1996 году,⁹ зарегистрирован в Бразилии в 2003 году и предоставляется в рамках Бразильской программы отпуска дорогостоящих лекарственных препаратов. Лечение ЦД ложится значительным бременем на систему здравоохранения, поэтому сравнение эффективности и безопасности доступных лекарственных препаратов имеет первостепенное значение.

МЕТОДЫ

Это проспективное, рандомизированное, двойное слепое исследование, проведенное в клинической больнице Государственного университета Кампинаса (Сан-Паулу, Бразилия) с целью сравнения клинической эффективности и переносимости, а также определения эквивалентной дозы Prosigne и Botox при лечении ЦД. Данное исследование проводилось в соответствии с Надлежащей клинической практикой (1997 г.), Хельсинкской декларацией и применимыми национальными нормативными актами. Клинический протокол и форма информированного согласия были одобрены этическим комитетом данного учреждения.

Критерии включения: возраст 18 лет и старше, клинический диагноз первичной ЦД, отсутствие предшествующих инъекций ботулинического токсина типа А и отсутствие применения ботулинического токсина типа А в течение предыдущих 24 недель.

Кафедра неврологии Факультета медицинских наук Университета Кампинас, Сан-Паулу, Бразилия.

Адресуйте корреспонденцию и запросы на перепечатку Элизабет Марии Апаресиде Барашневичус Квальято, доктору медицинских наук, Руа Альфредо Калил, 187, Жардим-дас-Палмейрас, Кампинас, Сан-Паулу, 13101-507 Бразилия; Эл. почта: bethbara@yahoo.com

Все авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Все права защищены(R) 2010 Lippincott Williams & Wilkins
DOI: 10.1097/WNF.0b013e3181c46f48

Критериями исключения были: известная гиперчувствительность к БТА или его соответствующим компонентам, масса тела менее 45 кг, общий балл по шкале TWSTRS менее 30, балл тяжести заболевания менее 15, балл нетрудоспособности менее 3 и балл боли менее 1. Из исследования были исключены пациенты, которым ранее требовались инъекции Prosigne или Botox в дозах менее 100 ЕД или более 300 ЕД, а также пациенты с подозрением на активное воспаление. К другим критериям исключения относились беременность или послеродовой период, алкоголизм, терапия аминагликозидами или другими препаратами, которые могли бы повлиять на нервно-мышечную передачу в течение периода исследования, нервно-мышечные заболевания и другие состояния, которые могли бы создать дополнительные риски.

Каждый флакон с 100 ЕД Botox или Prosigne разбавляли 2 мл 0,9% стерильного физиологического раствора и немедленно вводили инъекционно. И врачи, и пациенты не знали, какой именно препарат используется. Пациенты были случайным образом распределены на две группы для получения 300 ЕД одного из двух токсинов. Один из исследователей, не принимавший участия в процедурах инъекций и не знавший, какой токсин использовался, осматривал пациентов.

В соответствии с потребностями каждого пациента, инъекции проводились в мышцы, ответственные за аномальные движения, как показано в Таблице 1.

Было запланировано четыре визита: скрининг (V1), инъекция (V2), 4 недели после инъекции (V3) и 16 недель после инъекции (V4). Эффективность оценивали с помощью шкалы TWSTRS до инъекции, а также через 4 и 16 недель. Восприятие боли и жжения пациентами оценивалось непосредственно после инъекции токсина. Эффективностью (отличные, хорошие, обычные и плохие результаты), НЯ, причинно-следственная связь (связаны, возможно связаны или не связаны с инъекцией) и их тяжесть (легкая, умеренная или тяжелая) оценивались во время визитов после применения препарата. Переносимость оценивалась как отличная (отсутствие НЯ), очень хорошая (1 случай легких НЯ в течение 2 лет), хорошая (1 случай умеренных и 1 случай легких НЯ в течение 2 лет), обычная (1 случай умеренных и 3 или более легких НЯ в течение 2 лет) или плохая (1 или более серьезных НЯ). Качество жизни оценивалось до инъекции и через 16 недель с использованием краткой формы опросника SF-36.

Основным показателем результата было изменение баллов по шкале TWSTRS между исходным уровнем и контрольным визитом (V3 и V4). Шкала TWSTRS — это клиническая шкала, оценивающая тяжесть состояния, степень нетрудоспособности и боль. В качестве вторичных показателей эффективности рассматривались продолжительность действия (определяемая как интервал между днем лечения и днем, когда пациент сообщил об ослаблении эффекта), частота нежелательных явлений и качество жизни до инъекций и на 4-й день после инъекции. Пациентов систематически опрашивали о дисфагии, дисфонии, шейной гипотонии и астении, а также разрешали сообщать о любых других НЯ и о возникновении боли или жжения во время инъекций (да или нет). Данные были введены в программу Microsoft Access, а описательный анализ и построение графиков были выполнены с помощью системы статистического анализа для Windows версии 9.1.3 Service Pack 3 (SAS Institute Inc, Кэри, Северная Каролина). Для статистического анализа уровень значимости составлял 5% ($\geq 0,05$); а степень (1 *j* A) составила 80% (A G 0,20).

ТАБЛИЦА 1. Характеристики CD и задействованных мышц

Кривошея	Ипсилатеральная сплениальная мышца головы и контралатеральная грудино-ключично-сосцевидная мышца
Латероколлиз	Ипсилатеральная грудино-ключично-сосцевидная мышца, сплениальная мышца головы, лестничная мышца, мышца, поднижающая лопатку, полуостистая мышца головы и длинная мышца головы
Ретроколлиз	Двусторонняя мышца головы, верхняя трапециевидная мышца, полуостистая мышца головы и длинная мышца головы
Антероколлиз	Грудино-ключично-сосцевидная мышца, лестничные мышцы и двусторонний подбородочный комплекс

* 2010 Lippincott Williams & Wilkins

Соотношения сравнивали с помощью теста W^2 и точного теста Фишера, когда это было указано. Для сравнения непрерывных и упорядоченных показателей между двумя группами использовался критерий Манна-Уитни, а для сравнения переменных между группами лечения и визитами — дисперсионный анализ (ANOVA с ранжированными значениями) с повторными измерениями. Что касается непрерывных переменных, то объем выборки, доступный для исследования ($n = n_1 = n_2 = 12$) для оценки эквивалентности методов лечения, позволил выявить различия в каждом из результатов теста после лечения, которые составили 85% от SD, с ранее определенными $> \alpha$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Двенадцать пациенток получили инъекции Botox (8 женщин), а 12 — инъекции препарата Prosigne (5 женщин); распределение пациенток в обеих группах было сопоставимым ($P = 0,22$). Средний возраст (стандартное отклонение) был схожим ($P = 0,60$) в обеих группах, получавших Botox и Prosigne: 51 (15,2) год (диапазон 24Y71 года) и 48 (12,4) лет (диапазон 26Y66 лет) соответственно.

Среднее время с момента начала CD в группе, получавшей Botox, составило 7,5 (5,1) лет (диапазон 1 год 19 лет) и было аналогично ($P = 0,67$) показателю в группе, получавшей Prosigne, который составил 9,5 (7,4) лет (диапазон 1 год 24 года). Среднее время, прошедшее с момента последней инъекции, также было одинаковым в обеих группах ($P = 1,00$): 17,1 (11) месяцев в группе Botox и 15,5 (2,2) месяцев в группе Prosigne.

Восемь пациенток в группе, получавшей Botox, и девять в группе, получавшей Prosigne, сообщили о боли во время инъекции ($P = 1,00$, точный тест Фишера), тогда как ощущение жжения было отмечено у 6 и 2 пациентов соответственно ($P = 0,193$, точный тест Фишера).

Через четыре недели после инъекции не было выявлено существенной разницы в результатах ($P = 1,00$, точный тест Фишера), которые были оценены как отличные или хорошие 9 пациентами (75%); 3 из них регулярно принимали препарат в группе Botox и 10 пациентами (83,3%); 2 из них регулярно принимали препарат в группе Prosigne. Побочные эффекты были зарегистрированы у 14 пациентов (58,3%); по 7 в каждой группе): отек в месте инъекции наблюдался у 1 пациента (7,1%) в группе Prosigne, синяки — у 2 пациентов (14,3%); по 1 пациенту в каждой группе), боль после инъекции — у 5 пациентов (35,7%); все в группе Botox), астения — у 3 пациентов (21,4%); 2 в группе Botox и 1 в группе Prosigne), и переходящая легкая дисфагия — у 9 пациентов (64,4%); 4 в группе Botox и 5 в группе Prosigne). Значимых различий между группами по частоте возникновения нежелательных явлений и частоте каждого типа событий выявлено не было.

Хотя 13 пациентов (54,2%) сообщили о временной слабости мышц, в которые были сделаны инъекции (7 случаев Botox и 6 случаев применения Prosigne), это было расценено как ожидаемый результат, а не как нежелательное явление.

Все побочные эффекты были связаны с инъекциями, и их интенсивность была сопоставима в обеих группах ($P = 0,55$): легкие наблюдались у 11 пациентов (78,6%); 6 — Botox и 5 — Prosigne), а умеренные — у 3 (21,4%); 1 — Botox и 2 — Prosigne). Переносимость была оценена как отличная у 10 пациентов (41,7%); по 5 в каждой группе), у которых не наблюдалось никаких побочных эффектов, очень хорошая у 11 пациентов (45,8%); 6 в группе Botox и 5 в группе Prosigne), хорошая у 2 пациентов (8,3%); по 1 в каждой группе) и удовлетворительная у 1 пациента (4,2%), получившего Prosigne.

Длительность действия инъекции составила 11,7 (3,4) недель (диапазон 4–16 недель) в группе Botox и 12,3 (2,7) недель (диапазон 8–16 недель) в группе Prosigne ($P = 0,79$; U-критерий Манна-Уитни). Результаты теста TWSTRS показаны на Рисунке 1.

Показатели тяжести по шкале TWSTRS были схожи в обеих группах ($P = 0,53$; ANOVA) и снизились через 4 и 16 недель (PG 0,0001; значимые различия между V1 и V3, V1 и V4, а также V3 и V4). В ходе этих трех оценок не было выявлено существенной разницы между группами по уровню токсинов ($P = 0,62$; контрастный тест). Показатели нетрудоспособности также были сопоставимы ($P = 0,52$; ANOVA) и снизились на этапах V3 и V4 в обеих группах (PG 0,0001; со значительными различиями между V1 и V3, V1 и V4, а также V3 и V4).

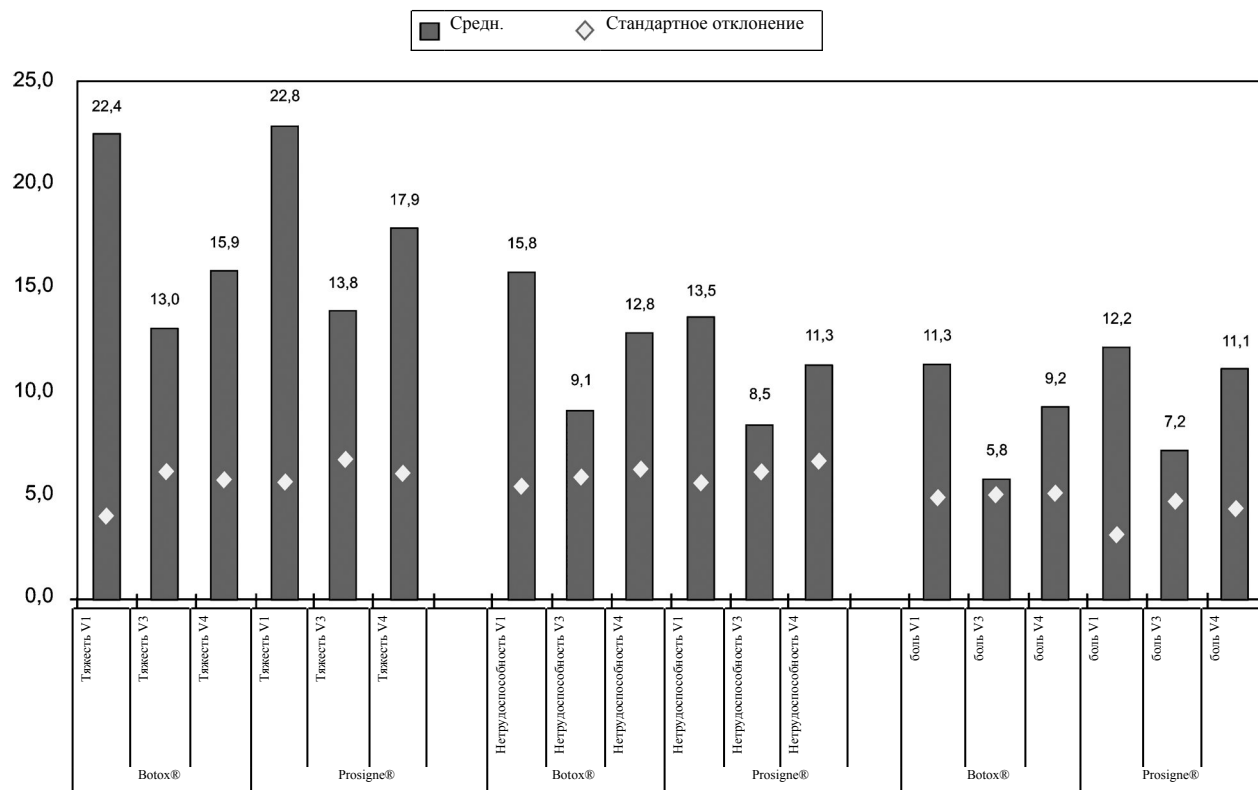


РИСУНОК 1. Описательный анализ показателей TWSTRS до (V1), через 4 (V3) и 16 (V4) недель после применения Botox и Prosigne для сравнения.

Показатели боли не различались между группами, получавшими Botox и Prosigne ($P = 0,44$; ANOVA), однако снижение показателей наблюдалось в обеих группах через 4 и 16 недель (PG 0,0001; значимые различия между V1 и V3, V1 и V4, а также V3 и V4). Общие баллы были схожими для обоих токсинов ($P = 0,82$; ANOVA), и снижение баллов наблюдалось через 4 и 16 недель в обеих группах (PG 0,0001; значимая разница между V1 и V2, V1 и V3, а также V2 и V3).

На Рисунке 2 показаны результаты SF-36 до (V1) и через 16 недель после (V3) инъекции в обеих группах.

Результаты по эмоциональным аспектам не показали различий между двумя группами, подвергшимися воздействию токсинов ($P = 0,20$; ANOVA), или между двумя визитами ($P = 0,06$). Что касается физических аспектов, то различий между двумя группами, получавшими разные токсины, также не наблюдалось ($P = 0,25$), как и между двумя визитами ($P = 0,09$).

Повторные измерения социальных аспектов не выявили различий между двумя токсинами ($P = 0,83$; ANOVA) или двумя посещениями ($P = 0,02$). Что касается функциональной способности, то различий между двумя группами, получавшими разные токсины, не наблюдалось ($P = 0,45$), как и между двумя визитами ($P = 0,49$). В этой области контрастный тест также не выявил каких-либо существенных различий между двумя визитами или уровнями токсинов ($P = 0,19$). В отношении болевого синдрома различий между группами, получавшими разные токсины, или между визитами обнаружено не было ($P = 0,20$), за исключением сравнения визитов 1 и 3 ($P = 0,0006$).

В целом, по состоянию здоровья различий между двумя группами токсинов обнаружено не было ($P = 0,69$), как и между двумя визитами ($P = 0,51$). Результаты в отношении психического здоровья были схожими для обеих групп токсинов ($P = 0,07$) и для обоих визитов ($P = 0,12$).

Различий между двумя токсинами по показателю жизненной энергии обнаружено не было; однако между первым и третьим визитами наблюдалась разница ($P = 0,049$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В этом рандомизированном двойном слепом исследовании сравнивали действие Botox и препарата Prosigne у 24 пациентов с CD. Обе группы были схожи по возрасту, клинической картине, среднему времени с момента начала заболевания и среднему времени с момента последней инъекции, причем последнее было достаточно длительным, чтобы исключить любые остаточные последствия последней инъекции. Боль и жжение во время инъекции одинаково отмечались в обеих группах.

На 4-й неделе после инъекции 58,3% пациентов сообщили о побочных эффектах, все из которых были связаны с инъекциями и равномерно распределены между обеими группами. По нашему опыту, типичная доза ботулинического токсина для лечения CD составляет 200 ЕД для женщин и 300 для мужчин, поскольку у мужчин более крупные шейные мышцы. Методологические соображения побудили нас установить одинаковую дозу для всех пациентов, не учитывая пол, и, вероятно, для некоторых испытуемых это была передозировка, что объясняет высокую частоту побочных эффектов.

Нежелательные явления, такие как отек, синяки и боль в месте инъекции, наблюдались у небольшого числа пациентов и были сопоставимы для обоих токсинов. Астению и легкую дисфагию, соответственно, отметили 21,4% и 64,4% пациентов, при этом частота их возникновения была сопоставима в обеих группах. Согласно литературным данным, средняя частота дисфагии, связанной с инъекциями БТА, колеблется от 10% до 26%,^{10,11} иногда сопровождается сухостью во рту. Более высокая частота возникновения дисфагии, наблюдаемая в этом исследовании, была связана с высокой дозой ботулинического токсина типа А и частыми инъекциями в грудино-ключично-сосцевидную мышцу, лестничные мышцы и двусторонний подбородочный комплекс.

SF-36 - Botox против Prosigne при спастической кривошее

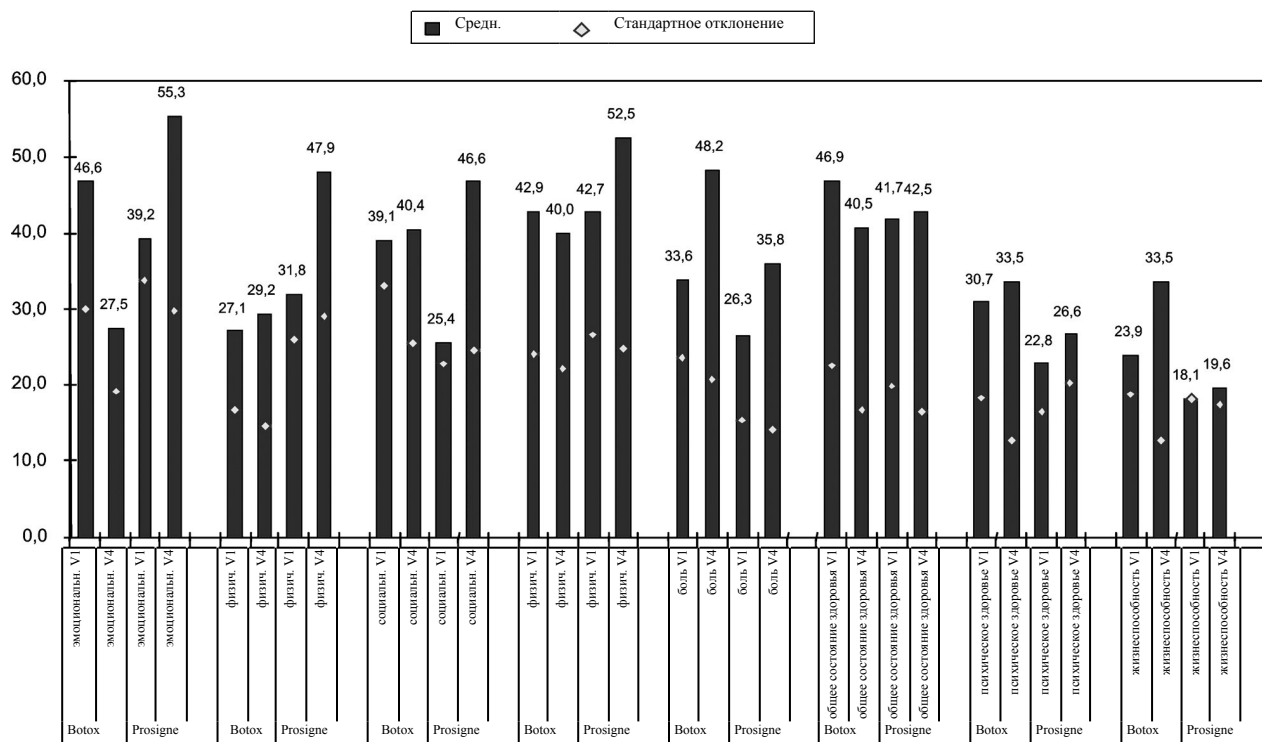


РИСУНОК 2. Оценка проводилась с помощью опросника SF-36 до и через 16 недель после инъекции.

Ни один из пациентов не жаловался на сухость во рту.

Значимых различий между группами по частоте нежелательных явлений или частоте каждого типа событий выявлено не было. Что касается интенсивности, она оказалась схожей в обеих группах: от легкой у 78,6% до умеренной у 21,4%.

Через 4 недели результаты были оценены как отличные (41,7%), хорошие (37,5%) и удовлетворительные (20,8%) сопоставимым числом пациентов в обеих группах. Временная слабость мышц, в которые был сделан инъекции, наблюдаемая у 54,2% пациентов, является распространенным ожидаемым эффектом, который не повлиял на клинические результаты и, следовательно, не был расценен как нежелательное явление.

Переносимость и продолжительность действия инъекции также были схожими в обеих группах (приблизительно 12 недель), что подтверждает данные литературы¹⁰. Однако к 16-й неделе показатели TWSTRS не вернулись к исходным значениям.

Показатели TWSTRS не выявили каких-либо различий между токсинами. При этом показатели тяжести состояния, нетрудоспособности и боли улучшились на 4-й и 16-й неделях обследования. В обеих группах наиболее выраженное улучшение наблюдалось через 4 недели, что подтверждается данными литературы.¹⁰

Несмотря на объективное улучшение состояния пациентов, португальская версия опросника SF-36 оказалась ограниченным инструментом для оценки пациентов со спастической кривошеей, поскольку по большинству пунктов, за исключением пунктов, касающихся боли и жизненной энергии, не было выявлено значительных изменений. Улучшение качества жизни было сопоставимым при воздействии обоих токсинов.

Тан и Ван¹² описали у пациентов с CD, что доза Prosigne, которая вызывала эффекты, сходные с эффектами Botox, была выше, но в этом исследовании, в котором использовалось соотношение Botox и Prosigne в соотношении 1:1, были получены одинаковые клинические эффекты и частота возникновения НЯ при применении обоих препаратов.

Botox и Prosigne оказались одинаково безопасными и эффективными в лечении CD. Ограничением нашего исследования является небольшое количество пациентов (24), но мы использовали те же методы и инструменты оценки, что и предыдущие авторы. Необходимы дальнейшие исследования для определения соотношения затрат и выгод среди всех коммерчески доступных БТА.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Бразильской программе по отпуску дорогостоящих лекарственных препаратов за предоставление препарата Prosigne, а также компании Cristalia Chemical and Pharmaceutical Products за предоставление препарата Botox для данного исследования.

ССЫЛКИ

1. Хаерер А.Ф. В книге Де Йонга «Неврологическое обследование». 5-е изд. Филадельфия, США: Lippincott Williams & Wilkins; 1992; Глава 31: 402Y419.
2. Питанги И. Quo vadis doctor. Rev Bras Cir 1993;83(6):257Y262.
3. Шанц Э. Дж., Джонсон Э. А. Свойства и применение ботулинического токсина и других микробных нейротоксинов в медицине. Microbiol Rev 1992;56(1):80Y99.
4. Брин М.Ф., Янкович Дж., Комелла С. и др. Лечение дистонии с помощью ботулинического токсина. В: Курлан Р., ред. Двигательные расстройства. 1-е изд. Филадельфия, США: Lippincott Williams & Wilkins; 1995; Chapter 6:183Y246.
5. Андерсон Т., Танд С., Марден Д. Ботулотоксин для лечения спастической кривошеи и других двигательных расстройств. В: Лозано А.М., Гилденберг П.Л., Таскер Р.Р., ред. Учебник по стереотактической и функциональной нейрохирургии. 1-е изд. Нью-Йорк, США: Springer Verlag; 1998; Chapter109:1059Y1069.
6. Симпсон Д.М., Блисер А., Брашир А. и др. Оценка: нейротоксин ботулина для лечения двигательных расстройств (обзор, основанный на доказательствах): отчет Подкомитета по оценке терапевтических средств и технологий Американской академии неврологии. Neurology 2008;70:1699Y1706.

7. Рану Д., Гури С., Фондараи Дж. и др. Соответствующая эффективность Botox и Dysport: двойное слепое рандомизированное перекрестное исследование при цервикальной дистонии. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72: 459Y462.
8. Брефель-Курбон С., Симонетта-Моро М., Мор С. и др. Фармакоэкономическая оценка ботулинического токсина при лечении спастической кривошеи. *Clin Neuropharmacol* 2000;23(4): 203Y207.
9. Ван Ю.С., Чжуан Х., Хуан Б.Г. и др. Получение кристаллического ботулинического токсина типа А для терапевтического применения и создание экспериментальной модели на животных. *J Biol Prod* 1990;3(3):121Y125.
10. Комелла К.Л., Янкович Дж., Шеннон К.М. и др. Сравнение серотипов А и В ботулинического токсина для лечения цервикальной дистонии. *Neurology* 2005;65:1423Y1429.
11. Чапман М.А., Баррон Р., Танис Д.К. и др. Сравнение препаратов ботулинического нейротоксина для лечения цервикальной дистонии. *Clin Ther* 2007;29(7):1325Y1337.
12. Тан Х., Ван Х. Сравнение Botox с китайским ботулиническим токсином типа А. *Chin Med J* 2000;113(9):794Y798.