

# МИКРОАЛЬБУМИНУРИЯ КАК ФАКТОР ПРОГНОЗА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И МАРКЕР ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ

Л.А. Хаишева, Л.И. Кательницкая

Ростовский государственный медицинский университет

## Микроальбуминурия как фактор прогноза сердечно-сосудистых осложнений и маркер эффективности терапии у пациентов с артериальной гипертензией

Л.А. Хаишева, Л.И. Кательницкая

Ростовский государственный медицинский университет

**Цель.** Оценить микроальбуминурию (МАУ) и эластичность сосудистой стенки у пациентов с эссенциальной артериальной гипертензией (АГ) и возможности снижения у них фатального сердечно-сосудистого риска благодаря приему ингибитора АПФ лизиноприла (Листрил, Dr. Reddy's).

**Материалы и методы.** Обследовали 42 больных АГ в возрасте  $60,3 \pm 0,83$  лет. Скорость распространения пульсовой волны (СРПВ) оценивали методом объемной сфигмографии. Для определения МАУ использовали микраль-тест (Рош Диагностика, Германия). В качестве первого гипотензивного препарата использовали лизиноприл, при необходимости дозу препарата увеличивали или добавляли амлодипин (Стамло М, Dr. Reddy's). Продолжительность лечения была 12 нед.

**Результаты.** У пациентов с АГ и повышенным индексом массы тела МАУ выявляли чаще, чем в общей популяции больных АГ. МАУ ассоциируется с повышенной жесткостью сосудистой стенки. Применение лизиноприла уже через 4 нед позволило достичь целевого артериального давления (АД) у 42,9% пациентов и снизить МАУ на 54,5%. Продолжение лечения в течение 12 нед привело к достижению целевого АД у 90,4% больных и снизить фатальный сердечно-сосудистый риск на 36,6%.

**Заключение.** У больных АГ лечение лизиноприлом приводит к значимому снижению АД, МАУ и фатального сердечно-сосудистого риска.

**Ключевые слова:** гипертоническая болезнь, скорость пульсовой волны, микроальбуминурия, лизиноприл

**РФК 2008;1:51-55**

## Microalbuminuria as a forecast factor for cardio-vascular complications and a marker of therapy efficacy in patients with arterial hypertension

L.A. Haisheva, L.I. Katelnitskaya

Rostov State Medical University

**Aim.** To assess the microalbuminuria (MAU) and vascular wall elasticity in patients with essential hypertension (HT) and evaluate the possibilities to reduce in fatal cardiovascular risk due to lisinopril (Listril, Dr Reddy's) therapy.

**Material and methods.** 42 patients ( $60,3 \pm 0,83$  y.o.) with HT were involved in the study. Pulse wave velocity was estimated by volume sphygmography. MAU levels were detected with micral-test (Roche Diagnostics, Germany). Patients received lisinopril as a first-step antihypertensive drug, if necessary the dose of lisinopril was increased or amlodipine was added. The treatment lasted for 12 weeks.

**Results.** MAU was revealed more often in patients with increased body mass index as compared with whole population of hypertensive patients. MAU was associated with increased vascular wall stiffness. Lisinopril therapy during 4 weeks allowed to reach target level of blood pressure (BP) in 42,9% of patients and decreased in MAU level by 54,5%. Therapy continuation during 12 weeks allowed to reach target level of BP in 90,4% of patients and reduce in fatal cardiovascular risk by 36,6%.

**Conclusion.** Lisinopril therapy resulted in significant reduction in BP, MAU and fatal cardiovascular risk in patients with HT.

**Key words:** essential arterial hypertension, pulse wave velocity, microalbuminuria, lisinopril

**Rational Pharmacother. Card. 2008;1:51-55**

Во 2-ой версии Российских рекомендаций по профилактике, диагностике и лечению артериальной гипертензии (АГ) сформулирована основная цель лечения – снижение риска смерти от сердечно-сосудистых осложнений [1]. Прогноз больного АГ определяется, в первую очередь, выраженностью морфофункциональных изменений органов-мишеней [2, 12]. Роль почек в патогенезе и прогрессировании АГ вновь стала предметом оживленной дискуссии, остроту которой придает наличие длительного периода латентной почечной дисфункции [5]. На этом доклиническом этапе поражения почек показатели, широко используемые в практике (уровень креатинина в сыворотке, скорость клубочковой фильтрации, уровень протеинурии и т.д.), не изменяются, а потому не позволяют врачу су-

дить о выраженности процессов нарушения функции почек [15].

Среди маркеров начального периода почечной дисфункции ведущее место занимает микроальбуминурия (МАУ) [6]. За МАУ принимается скорость экскреции альбумина с мочой в пределах от 20-30 до 300 мкг/мин (менее 300 мг/сут). Скорость экскреции альбумина при исходно повышенном ее уровне в отсутствие терапии за год возрастает примерно на 25 мкг/мин [3,4].

Внедрение в клиническую практику количественных методов обнаружения МАУ позволило оценить частоту этого феномена не только у пациентов, страдающих сахарным диабетом, но и в общей популяции, особенно при АГ и других сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ), что способствовало коренному пересмотру

взглядов на данный лабораторный феномен [17]. В настоящее время МАУ рассматривается как важный самостоятельный признак повышенного риска развития сердечно-сосудистых осложнений и смерти больных АГ, сахарным диабетом и в общей популяции, отражающий системную сосудистую дисфункцию [8].

Повышение АД само по себе может быть причиной протеинурии вследствие увеличения давления в клубочковых капиллярах и фильтрационного давления. Протеинурия обнаруживается не только у больных АГ, но и у их здоровых родственников, что можно связать с генетическими особенностями сосудистой стенки.

Цель исследования – выявление микроальбуминурии, изучение особенностей сосудистой стенки и оценка возможности снижения фатального сердечно-сосудистого риска на фоне приема Листрила (лизиноприл, Dr. Reddy's) у больных эссенциальной АГ.

## Материал и методы

В открытом исследовании участвовали 42 пациента с АГ 1-2 степени; средний возраст –  $60,3 \pm 0,83$  лет, средняя длительность заболевания –  $10,3 \pm 0,69$  лет. Критериями исключения из исследования были: наличие острых заболеваний бронхолегочной системы, желудочно-кишечного тракта, нервной системы, гематологических, эндокринологических и аутоиммунных заболеваний, тяжелых расстройств функции печени, почек, тяжелой или злокачественной АГ, всех форм вторичных АГ, инфаркта миокарда, острого нарушения мозгового кровообращения, сердечной недостаточности, стеноза устья аорты, нарушений ритма сердца, злокачественных новообразований.

Оценивали исходную тяжесть АГ, соответствие критериям включения и исключения и возможность проведения монотерапии. За 7 дней до включения в исследование пациентам отменяли предшествующую антигипертензивную терапию.

У всех пациентов диагноз АГ был установлен на основании клинических «казуальных» измерений АД [11]. На 1-м визите проводился сбор анамнестических данных и оценка факторов риска (ФР) – пол, возраст, наследственность, индекс массы тела, показатели липидограммы, уровень АД, статус курения, а также жесткость сосудистой стенки (по скорости распространения пульсовой волны). Для определения риска смерти от ССЗ в ближайшие 10 лет у пациентов использовали систему подсчета баллов SCORE - Systematic Coronary Risk Evaluation, рекомендованную для практического здравоохранения экспертами Всероссийского научного общества кардиологов. При этом 0-1% по шкале SCORE расценивали как низкий риск, 2-5% - как средний, от 6 до 9% - как высокий 10-летний риск фатального ССЗ; 9% и выше - как очень высокий риск смерти от ССЗ в ближайшие 10 лет.

Индекс массы тела (ИМТ) [масса тела (кг)/рост ( $m^2$ )] интерпретировали в соответствии с классификацией ВОЗ: ИМТ  $< 18,0$  кг/ $m^2$  – истощение, недостаточная масса тела; до  $24,9$  кг/ $m^2$  – нормальная масса тела; от  $25$  до  $29,9$  кг/ $m^2$  – избыточная масса тела; от  $30$  до  $34,9$  кг/ $m^2$  – ожирение I степени; от  $35$  до  $40$  кг/ $m^2$  – ожирение II степени;  $> 40$  кг/ $m^2$  – ожирение III степени.

Методом объемной сфигмографии регистрировали скорость распространения пульсовой волны (СРПВ). Этот показатель с возрастом увеличивается, причем несколько в большей степени по сосудам эластического типа, чем мышечного. По данным Ludwig (1936), в норме СРПВ по сосудам эластического типа (Сэ м/с) для возраста 14-30 лет составляет  $5,7$ ; 31-50 лет –  $6,6$ ; 51-70 лет –  $8,5$ ; 71 и старше –  $9,8$ ; по сосудам мышечного типа (См м/с) для возраста 14-20 лет СРПВ составляет  $6,1$ ; 21-30 лет –  $6,8$ ; 31-40 лет –  $7,1$ ; 41-50 лет –  $7,4$ ; 51 и старше –  $9,3$ .

Исследование проводили на компьютерном комплексе для изучения электрической и механической деятельности сердечно-сосудистой системы («Поли-Спектр». ООО «Нейро-Софт», Иваново). СРПВ оценивали по артериям мышечного и эластического типа. Результаты считались объективными при коэффициенте репрезентативности не менее  $0,890$  и коэффициенте повторяемости  $0,935$  [14].

Для определения МАУ использовали микраль-тест (тест-полоски для определения МАУ до  $100$  мг/л фирмы «Рош Диагностика ГмБХ», ФРГ). Для того чтобы определить концентрацию альбумина свыше  $100$  мг/л, образец мочи разбавляли, смешивая одну часть мочи с двумя частями воды. Исходное значение концентрации альбумина получали при умножении полученного результата на 3. Нижняя граница определения:  $20$  мг/л. Референтный метод: количественное иммунологическое определение.

Вышеперечисленные исследования с определением суммарного риска фатального ССЗ проводились на 1-м визите, после чего назначался в качестве гипотензивной терапии Листрил в дозе 5-10 мг в сутки (лизиноприл, Dr. Reddy's). Эффективность гипотензивной терапии оценивали каждые 4 недели, при недостижении целевых значений АД на втором визите дозу Листрила увеличивали до 10-20 мг в сутки или добавляли амлодипин (Стамло М, Dr. Reddy's) в дозе 5 мг. На третьем визите к 10-20 мг Листрила добавляли Стамло М  $10$  мг/сут (рис. 1). Через 12 недель (визит 4) оценивали риск по шкале SCORE и определяли СРПВ и МАУ.

Статистическая обработка данных проведена с использованием программы статистического анализа «Statistica 6» (Statsoft, США). Результаты представлены в виде средних величин и их ошибки ( $M \pm m$ ). За значимые принимались отличия при  $p < 0,05$ . Достоверность динамики изучаемых количественных показателей

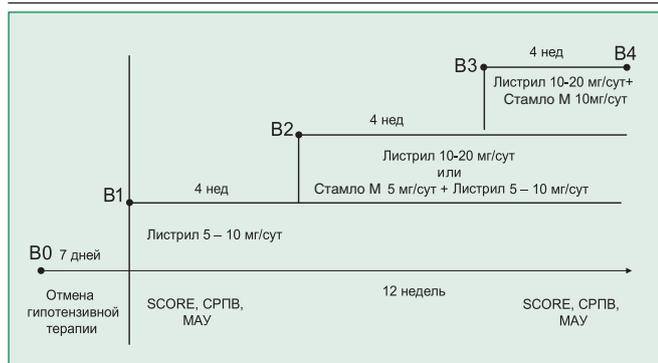


Рисунок 1. Дизайн исследования (V0-V4 - визиты)

оценивали по  $t$  – критерию Стьюдента для парных измерений, а достоверность различий частотных показателей - по критерию Фишера. Связь между ранговыми показателями до и после лечения вычисляли на основе таблиц сопряженности, а достоверность указанной связи рассчитывали с помощью критерия Пирсона  $\chi^2$ .

### Результаты и обсуждение

Все пациенты были старше 50 лет, из них 26 женщин (61,9%) и 16 мужчин (38,1%). Поскольку все пациентки находились в состоянии постменопаузы, половые особенности в нашем исследовании не учитывались.

Средний уровень систолического АД (САД) по группе составил  $163,3 \pm 1,14$  мм рт.ст., а диастолического (ДАД) –  $95,3 \pm 0,26$  мм рт.ст. Лишь 4,9% пациентов (2 человека) имели нормальную массу тела; 28,6% обследованных (12 человек) имели избыточную массу тела, 22 (52,3%) – ожирение 1-ой степени и 14,2% (6 человек) – ожирение 2-ой степени. Среднее значение ИМТ по группе составило  $29,9 \pm 0,38$  кг/м<sup>2</sup>.

У 24 больных (57,3%) были выявлены сопутствующие заболевания печени и желчевыводящих путей: диффузные изменения паренхимы печени, желчно-каменная болезнь, повышение уровня АЛТ, АСТ, билирубина в крови. Признались в злоупотреблении алкоголем 8 мужчин и 1 женщина. Среди мужчин курили 11, а среди женщин – 3; исследование функции внешнего дыхания у 6 курильщиков (14,1%) обнаружило obstructive нарушения.

МАУ наблюдалась у 26,2% пациентов (11 человек). Это выше, чем в общей популяции [18]. Хорошо известна связь МАУ с ожирением; по данным исследования GUBBIO, при увеличении ИМТ на 4 кг/м<sup>2</sup> вероятность повышения экскреции альбумина с мочой увеличивалась в 1,83 раза у мужчин и в 1,33 раза у женщин [16]. Наиболее прогностически неблагоприятным считается абдоминальный тип ожирения. Значение увеличения окружности талии в качестве одной из ключевых детерминант МАУ подтверждено популяционными исследованиями [15, 19]. Вероятно, этим можно объяснить столь высокий процент МАУ среди наших больных,

поскольку только двое из них имели нормальный ИМТ.

Изменения свойств крупных сосудов, в частности – СРПВ, являются существенным фактором риска развития сердечно-сосудистых осложнений у больных АГ. СРПВ зависит от уровня АД и возрастных структурно-функциональных изменений артериальной стенки и является простым и воспроизводимым методом оценки жесткости артерий. У 29 пациентов (69%) с АГ обнаружено повышение СРПВ по сосудам эластического типа (Сэ), что указывает на увеличение жесткости сосудистой стенки. В целом по группе СРПВ по Сэ составила  $12,72 \pm 0,68$  м/с. Между возрастом и СРПВ по Сэ выявлена связь ( $r=0,51$ ;  $p<0,001$ ). СРПВ по сосудам мышечного типа имела незначительную тенденцию к увеличению (в среднем по группе  $8,84 \pm 0,72$  м/с). Корреляция этого показателя с возрастом отсутствовала. В то же время, обнаружена прямая достоверная связь средней силы между СРПВ по Сэ и МАУ ( $r=0,43$ ;  $p<0,05$ ).

Известно, что стойкая МАУ может быть следствием не только повышенного АД и гиперфильтрации, но и других ФР, основной мишенью которых является сосудистый эндотелий. Возникновение МАУ (локально-почечного маркера генерализованных нарушений функции эндотелия) всегда совпадает с другими проявлениями дисфункции эндотелия (например, ухудшением эндотелийзависимой вазодилатации [21, 24]). Наряду с функциональными расстройствами у больных с МАУ отмечают и признаки повреждения структур эндотелиоцитов (в частности – снижение объема гликокаликса). В конечном итоге повреждение эндотелия приводит к структурно-функциональным изменениям сосудистой стенки [23], чем можно объяснить выявленную в нашем исследовании взаимосвязь между СРПВ и МАУ.

Подавляющее большинство пациентов имело высокий или очень высокий риск смерти от ССЗ – 33 человека (78,6%) и лишь у 9 больных (21,4%) наблюдался низкий фатальный риск.

В 1975 г. под руководством D. Cushman и M. Ondetti был синтезирован каптоприл – препарат нового класса ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (ИАПФ) [1]. ИАПФ стали одним из основных средств лечения и профилактики ССЗ. ИАПФ являются не только эффективными антигипертензивными средствами, но и обладают многими другими положительными свойствами. Они оказывают позитивное влияние на два основных фактора прогрессирования почечной патологии – внутрисердечную гипертензию и тубулоинтерстициальный фиброз. Кроме того, уменьшая проницаемость стенки клубочковых капилляров, ИАПФ способствуют снижению экскреции альбумина с мочой [1, 10], уменьшают гипертрофию гладкомышеч-

ных клеток сосудистой стенки, ограничивая количество избыточного коллагена, снижают образование эндотелина, влияющего на продукцию фактора роста эндотелия [9].

Поскольку большая часть наших пациентов имела повышенный ИМТ и сопутствующую патологию печени, нами был выбран ИАПФ, который не метаболизируется в печени, – Листрил.

Через 4 недели терапии у 42,9% пациентов (18 человек) удалось достичь целевых значений АД, в целом по группе снижалось как САД (до  $142,3 \pm 1,3$  мм рт.ст.), так и ДАД (до  $91,1 \pm 0,31$  мм рт.ст.). Однако нормализация АД наблюдалась не у всех пациентов. В связи с этим была увеличена доза препарата или добавлен амлодипин (Стамло М, Dr. Reddy's) в дозе 5 мг. На следующем контрольном визите (через месяц) целевых значений АД достигло еще 14 человек. При дальнейшем увеличении доз лишь у 4-х пациентов не наблюдалось снижения АД до целевых значений. Таким образом, на монотерапии Листрилом удалось достичь целевых значений АД у 20 пациентов, доза препарата при этом составила  $14,2 \pm 2,3$  мг/сут. Проводимая гипотензивная терапия хорошо переносилась и не потребовала отмены или смены препарата.

Нормализация АД не всегда является гарантией нормализации экскреции альбумина с мочой. При низком уровне МАУ эффективны все препараты, нормализующие АД и почечную гемодинамику, но при более высоком уровне МАУ успех достигается только при применении ИАПФ или блокаторов рецепторов ангиотензина II [3, 20]. Нарастающий нефропротективный эффект данных препаратов прослеживается и после нормализации АД. Исходя из вышесказанного ошибочно говорить о МАУ в качественном аспекте этой патологии - "обнаружена" или "не обнаружена", так как очевидно различие пациентов по тяжести почечной дисфункции [7, 13]. Чем выше уровень МАУ, тем тяжелее состояние больного.

Назначение Листрила сопровождалось уменьшением уровня альбуминурии с 110 мг/л до 70 мг/л т.е. на 54,5% от исходного уже к концу 1-го месяца; эффект сохранялся на протяжении всего исследования и к его концу составлял 30%. Количество пациентов с МАУ уменьшилось до 5 человек.

Взаимосвязь МАУ с увеличением жесткости сосудистой стенки продемонстрирована в нескольких клинических исследованиях [22]. В течение 12 недель терапии не произошло никаких изменений в динамике СРПВ по См. Исходно пациенты имели повышенную жесткость сосудистой стенки, о чем свидетельствовала повышенная СРПВ по Сэ. Через 12 недель терапии произошло достоверное снижение данного показателя, однако СРПВ по Сэ не достигла нормальных значений и в среднем составила  $10,82 \pm 1,2$  м/с. В результате длительной

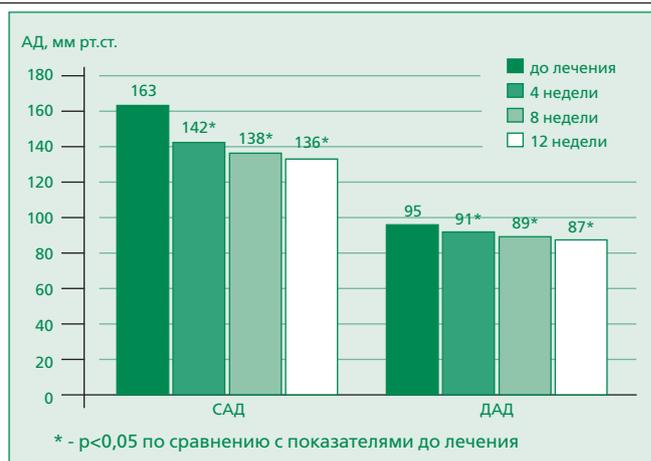


Рисунок 2. Динамика АД в течение 12-недельной терапии Листрилом

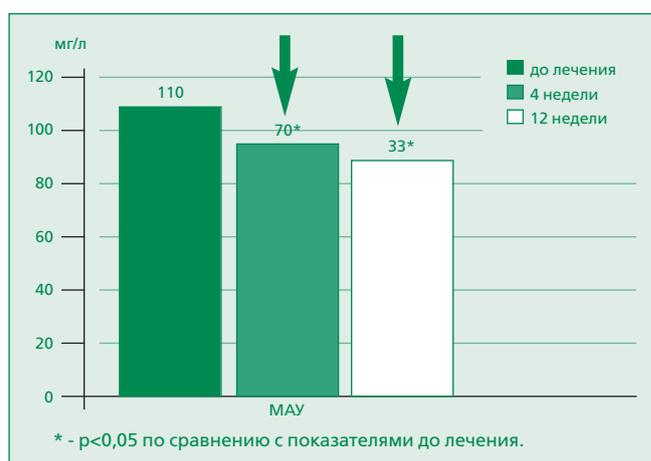


Рисунок 3. Динамика МАУ в течение 12-недельной терапии Листрилом



Рисунок 4. Изменение количества больных с различным уровнем сердечно-сосудистого риска (по модели SCORE) до и после 12-недельной терапии Листрилом

АГ в сосудистой стенке происходят структурные изменения, нормализация которых требует многомесячного, а скорее даже многолетнего приема препарата, что и не позволило нам в 3-х месячный срок нормализо-

вать данный показатель.

Через 12 недель терапии Листрилом проведена повторная оценка риска. Отмечено уменьшение доли пациентов, имеющих высокий и очень высокий фатальный риск ССЗ: если до начала терапии 10 пациентов имели очень высокий риск и 23 больных – высокий риск, то через 3 месяца терапии очень высокий риск сохранился только у 3-х пациентов (7,1%), а высокий – у 15 больных (35,7%). Количество больных со средним риском увеличилось с 9 до 17 человек (40,5%). У 7 (16,7%) человек в результате лечения риск фатального ССЗ стал низким.

## Выводы

1. У пациентов с эссенциальной АГ и повышенным ИМТ процент выявления МАУ выше, чем в общей популяции больных АГ. МАУ ассоциируется с повышенной жесткостью сосудистой стенки.

2. Монотерапия Листрилом уже через 4 недели позволила достичь целевого АД у 42,9% пациентов и снизить МАУ на 54,5%.

3. Гипотензивная терапия в течение 12 недель (основной первый препарат – Листрил) позволила достичь целевых значений АД у 90,4% пациентов и снизить риск фатального ССЗ на 36,6%.

## Литература

1. Агеев Ф.Т., Мареев В.Ю. Фозиноприл в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. РМЖ 2000;8(2):94-9.
2. Алмазов В.А., Шляхто Е.В. Гипертоническая болезнь. Москва, 2000. 118 с.
3. Арутюнов Г.П., Чернявская Т.К., Лукичева Т.И. и др. Микроальбуминурия и пути ее медикаментозной коррекции. Клин фармакол тер. 1999;3: 23-8.
4. Вандер А., Физиология почек. Санкт-Петербург, 2000.
5. Ермоленко В.М. Хроническая почечная недостаточность. В кн.: Нефрология. Руководство для врачей. Под ред. И.Е. Тареевой. М.: Медицина, 1995. Т. 1. С. 322-90
6. Лифшиц Н.Л., Кутырина И.М. Особенности лечения гипертонии при хронических диффузных заболеваниях почек. Materia Medica. 1995;2: 39-50.
7. Моисеев В. С. Ингибиторы АПФ и нефропатия. Клин фармакол тер. - 1997;6(4):67-9.
8. Мухин Н.А., Моисеев В.С., Кобалава Ж.Д. и др. Кардиоренальные взаимодействия: клиническое значение и роль в патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой системы и почек. Тер арх. 2004;6:39-46.
9. Преображенский Д.В., Сидоренко Б.А. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента в лечении поражений почек различной этиологии. РМЖ 1998;6(24):19-25.
10. Преображенский Д.В., Сидоренко Б.А., Романова Н.Е., Шатунова И.М. Клиническая фармакология основных классов антигипертензивных препаратов. Consilium medicum. 2000; 2(3): 99-127
11. Профилактика, диагностика и лечение артериальной гипертонии. Российские рекомендации (2-ой пересмотр). Москва 2004 – 20 с.
12. Сагинова Е.А., Федорова Е.А., Фомин В.В. и др. Формирование поражения почек у больных ожирением. Тер. арх. 2005;5:36–41.
13. Элиот Г.Л. Применение ингибитора ангиотензинпревращающего фермента спираприла при хронической почечной недостаточности, гипертонии и диабетической нефропатии. Тер. архив 2000;10:2-6.
14. Asmar R., Benetos A., Topouchian J. et al. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies. Hypertension 1995;26(3):485-90.
15. Bonnet F, Marre M, Halimi JM et al. Waist circumference and the metabolic syndrome predict the development of elevated albuminuria in non-diabetic subjects: the DESIR Study. J Hypertens 2006; 24 (6):1157–63.
16. Cirillo M, Senigalliesi L, Laurenzi M et al. Microalbuminuria in nondiabetic adults: relation of blood pressure, body mass index, plasma cholesterol levels, and smoking: The Gubbio Population Study. Arch Intern Med 1998; 158 (17): 1933–9.
17. De Jong PE, Brenner BM. From secondary to primary prevention of progressive renal disease: the case for screening for albuminuria. Kidney Int 2004; 66: 2109–18.
18. Jones CA, Francis ME, Eberhardt MS et al. Microalbuminuria in the US population: third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Kidney Dis 2002; 39: 445–59.
19. Liese AD, Hense HW, Doring A. et al. Microalbuminuria, central adiposity and hypertension in the non-diabetic urban population of the MONICA Augsburg survey 1994/95. J Hum Hypertens 2001; 15: 799–804.
20. Mogensen C.E. Renoprotective role of ACE inhibitors in diabetic nephropathy. Br. Heart J. 1994;72 (3 suppl.):38-45.
21. Mogensen C.E. Systemic blood pressure and glomerular leakage with particular reference to diabetes and hypertension. J. Intern. Med. 1994;235:297-316.
22. Munakata M, Nunokawa T, Yoshinaga K et al. Brachial-ankle pulse wave velocity is an independent risk factor for microalbuminuria in patients with essential hypertension – a Japanese trial on the prognostic implication of pulse wave velocity (J-TOPP). Hypertens Res 2006; 29 (7): 515–21
23. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J et al. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. Diabetes 2006; 55 (4): 1127–32.
24. Pedrinelli R, Giampietro O, Carmassi F et al. Microalbuminuria and endothelial dysfunction in essential hypertension. Lancet 1994; 344: 14–8.