

Astmagenetik; et fagfelt i rask utvikling

SAMMENDRAG:

Mye har skjedd innen astmagenetik-forskningen i løp av de siste 10–15 årene. I denne artikkelen vil jeg gjengi astmagenetikens historie i korte trekk. Deretter ønsker jeg å presentere astmagenetik-prosjektet ved Miljø og Barneastma-gruppen (MBA-gruppen) ved Ullevål Universitetssykehus, vårt fokus og våre funn. Avslutningsvis diskuteres hvilken betydning denne genetiske kunnskapen kan ha i en klinisk hverdag.

Monica Cheng Munthe-Kaas
cand. med er stipendiat ved Miljø og Barneastma-gruppen, Ullevål Universitetssykehus

KONTAKTADRESSE:
Monica Cheng Munthe-Kaas
Barnesenteret
Ullevål Universitetssykehus
0407 Oslo
monicacm@medisin.uio.no

MONICA CHENG MUNTHE-KAAS, *Ullevål Universitetssykehus*

Astmagenetikken i korte trekk

Man har lenge visst at både astma og allergi til dels er arvelig. De første formelle familiestudiene som viste til en familieoppkopning av astma er fra tidlig 1900-tallet, henholdsvis fra 1909 (Drinkwater) og 1916 (Cooke & Van der Veer) (1). Disse studiene bidro til en bekreftelse av observasjonene om arvelighet, men det var fortsatt ikke mulig å kartlegge graden av arvelighet eller arvegangsmønstre.

På tross av denne allmenne kunnskapen, er det likevel ganske trygt å kalle genetiske studier av astma for et «ungt» fagfelt. Fra de første familiestudiene på begynnelsen av forrige århundre tok det drøyt 50 år til tvillingstudiene på 1970-tallet åpnet for nye perspektiver innen forskning av astma og arv. Ved å studere tvillingpar kan man få holdepunkter for i hvor stor grad en egenskap er påvirket av arv. Det bakenforliggende prinsippet er at man sammenligner eneggede tvillinger (som deler 100 % av sitt genetiske arvemateriale) og toeggede tvillinger (som i gjennomsnitt deler 50 % av sitt genetiske arvemateriale). Hvis gener påvirker sykdomsutvikling, vil man forvente at eneggede tvillinger er likere hverandre med tanke på sykdommen enn toeggede tvillinger. På denne måten har man kunnet estimere heritabilitet – det vil si hvor mye av variasjonen i en egenskap/sykdom på befolkningsplan som kan forklares av gener.

En av de første større tvillingstudier utført med tanke på astma er fra Edfors-Lubs i Sverige i 1971 (2). Her ble 7000 tvillingpar fra det svenske fødselsregisteret inkludert. Ved å sammenligne eneggede og toeggede tvillingpar fant man at 65 % av fenotypisk variasjon kunne for-

klares genetisk. I årene etter denne studien har det vært utført minst ni store astma-tvillingstudier. Med noen få enkelt-untak har prosentandelen av klinisk variasjon som kan forklares genetisk ligget mellom 60–79 %. Blant disse finner man en norsk retrospektiv studie utført av Harris et al. i 1997 (3) som viser til en heritabilitet på 0,75.

Den videre utvikling av astmagenetik-forskning har nærmest fortonet seg som ett kontinuerlig sprang. Ikke minst har rask og omfattende fremskritt innen genetisk teknologi akselerert utviklingen. Og denne teknologiske «revolusjonen» er det verdt å si noen ord om: Fra DNA-molekylet ble beskrevet for første gang av Watson og Crick i 1953, begynte man i 1985 for alvor å diskutere muligheten for å sekvensere hele det humane genomet. Prosjektet, *Det humane genomprosjekt* ble offisielt startet i USA i 1990 og ble etterfulgt av ti intense forskningsår, preget av en relativt løs sammenslutning av vitenskapsmiljøer i flere land med hovedtyngden fra USA og Storbritannia. Prosjektet har hovedsakelig vært offentlig finansiert og har også vært åpent. Alle gensekvenser er blitt lagt ut på internett-databaser, og har dermed vært tilgjengelig for offentligheten.

Første versjon av det humane genomet ble offisielt presentert i *Nature* og *Science* i 2001 (4, 5). Deler av genomet har riktignok vist seg vanskelig å undersøke og er derfor ennå ikke ferdig kartlagt. Dette overskygger likevel ikke det vesentligste utbyttet: Med en enkel datamaskin og nettkobling kan hvem som helst i dag koble seg på nettet, og mer eller mindre «lese» hele det humane genomet samt søke på gener eller enkelte genfrekvenser hos både mennesker og



Flere studier av eneggede og toeggede tvillingpar viser at 60–80% av astmaforekomsten kan forklares genetisk. De samlede resultatene fra forskningen på astma og genetik har imidlertid ikke vært entydige så langt. FOTO: BJARNE NYGÅRD/SAMFOTO

andre arter. Dette har unektelig vært til stor hjelp for alle som driver med genetisk forskning – deriblant astmagenetikkerforskning.

Det er i år elleve år siden publikasjonen av den første studien som gjennomførte en koblingsanalyse i forhold til astma og allergi (6). Koblingsstudier er, litt forenklet sagt, store familiestudier hvor man forsøker å avdekke områder i genomet som forekommer med samme mønster som spesifikke fenotyper. På denne måten har man kunnet identifisere koblingen mellom spesifikke genområder og astma- og allergifenotyper. Den første studien identifiserte koblinger til seks ulike kromosomområder (6). Siden er det gjennomført koblingsstudier som til sammen impliserer 19 av de 23 kromosomene vi har (7, 8).

I tillegg til koblingsstudier har man såkalte assosiasjonsstudier. Disse utforsker om det forekommer eventuelle assosiasjoner mellom enkeltgener (enten de befinner seg i de tidligere koblede områdene eller er genene til kjente proteiner) og astma/allergifenotyper. Per i dag fin-

nes det minst 490 artikler som omtaler minst 120 gener som har vært funnet assosiert til en eller annen astma- og/eller allergifenotype (9).

De samlede resultatene av astmagenetikkerforskningen har imidlertid ikke vært udelte oppløftende. Funnene har ikke vært entydige og er totalt sett ganske forvirrende. Fra et optimistisk utgangspunkt, der forhåpningen var å kunne identifisere de viktigste «astmagenene», befinner man seg for øyeblikket i en periode der man nærmest drukner i antall gener som viser assosiasjon til astma eller allergi i noen studier, men ikke i andre. Manglende replikasjon av genetiske assosiasjoner til astma og allergi i forskjellige populasjoner er heller regelen enn unntaket. Den anerkjente amerikanske astmagenetikeren Fernando Martinez (2003) har oppsummert det slik:

«[T]he most consistent feature of results of genetic studies of asthma is their conspicuous lack of any consistency». På den andre siden har dette mangfoldet, og de tilsynelatende motstridende resultatene fra de siste årenes forskning,

tvunget fram alternative hypoteser og forståelser av samspillet mellom genetik, miljø og utviklingen av astma og allergi.

Det er altså midt i denne perioden, med yrende aktivitet, stadige teknologiske fremskritt og tilsvarende eksponentielt økende antall publikasjoner, at vi i Miljø og Barneastma-gruppen (MBA) ved Ullevål Universitetssykehus i 2001 begynte vår forskning på astmagenetik.

Astmagenetikkerprosjektet ved Ullevål universitetssykehus

Studiepopulasjonene:

Astmagenetikkerprosjektet er basert på to forskjellige barnepopulasjoner. Den ene er barna i Miljø og Barneastma-studien (MBA-studien). Dette er en prospektiv studie ved Ullevål Sykehus som har fulgt friske barn født i 1992/1993 ved Aker og Ullevål sykehus fram til dags dato. I tillegg til spørreskjema data fra de to første leveår, har en rekke av barna vært undersøkt klinisk ved fødsel, to års alder og 10 års alder med tanke på utvikling av astma og allergi (10). Den andre studien er en internasjonal familiestudie, Gene- ▶

tics of Asthma International Network (GAIN). Dette er et nettverk hvor 11 sentra fra forskjellige land er inkludert med ca. 100 familier hver, og hvor seleksjonskriteriet er at to søsken i hver familie har astma (11). Norge er et av landene som er inkludert og har 103 astmafamilier med i prosjektet.

Hypotesen:

Sett fra et genetisk synspunkt er astma en nokså utfordrende sykdom å studere fordi det er en såpass multifaktoriell sykdom med mange forskjellige triggere og presentasjonsformer som kan variere i forskjellige faser av livet. Symptomene kan blant annet variere fra gjentakende episoder med tetthet i brystet og pustevansker til kronisk natthoste eller nedsatt aktivitetstoleranse. Disse episodene kan utløses av virale infeksjoner, av allergener, av stress eller aktivitet. Imidlertid har disse symptomene en fellesnevner, nemlig en inflammasjonstilstand i lungevevet som fører til luftveisobstruksjon. Dette var vårt utgangspunkt. Vi ønsket å fokusere på gener som kodet for forskjellige inflammasjonsmarkører, og undersøke om vi kunne finne sammenhenger mellom spesielle variasjoner av disse genene og utviklingen av astma og/eller allergi hos barn.

Genene:

Det første genet vi valgte å fokusere på var CTLA-4-genet, et gen som koder for et protein som uttrykkes på aktiverte T-celler og som hemmer videre T-celleaktiveringssignaler. Den fungerer derfor

som en «bremse» på immunreaksjonen og hindrer ukontrollert aktivering. Årsaken til at vi valgte å fokusere på dette genet, var at det nettopp da var publisert en artikkel i Nature som viste at spesifikke genvarianter av CTLA-4-genet disponerte for type 1-diabetes og andre autoimmune sykdommer (12), mens det var relativt lite informasjon om disse genvariantene og astma- og allergisykdommer. I våre analyser fant vi en assosiasjon mellom en CTLA-4-genvariant og forhøyet IgE samt allergi og astma (11). Dette inspirerte oss til å fortsette å undersøke gener som var involvert i T-celleaktivering og inflammasjonskaskaden. I tillegg til CTLA-4 valgte vi derfor å fokusere på genene til Human Leukocyte Antigen (HLA) klasse II-molekylet, Tumor Necrosis Factor (TNF), transkripsjonsfaktoren T-bet og Eosinophilic Cationic Protein (ECP). Hvordan er disse proteinene viktige i inflammasjonsprosessen? Kort beskrevet er HLA-molekylet og CTLA-4 involvert i antigenpresentasjon og aktivering av den immunologiske kaskadereaksjonen. T-bet er en sentral nukleær transkripsjonsfaktor som blant annet påvirker T-celledifferensiering i henholdsvis Th1-retning eller Th2-retning. TNF samt ECP er begge faktorer involvert i selve inflammasjonsresponsen (fig 1).

Resultater

I tillegg til at CTLA-4 var assosiert med forhøyet IgE og astma og allergi som referert over, fant vi forskjellige grader av assosiasjon mellom astma- og allergi-

fenotyper og spesifikke genetiske varianter av HLA (13), TNF1 (13), T-bet (14) og ECP (15). Dette styrker den generelle hypotesen om at arvelige variasjoner i immunsystemet vårt kan være med på å påvirke inflammasjon, og videre hva slags sykdommer vi er disponerte for. Imidlertid er det detaljene som bringer diskusjonen videre. Hvor stor «effekt» har disse genetiske variantene på astma- og allergiutvikling? Hvilke aspekter av astma- og allergifenotypen er det som blir påvirket? Og hvordan samsvarer våre funn med andre studier?

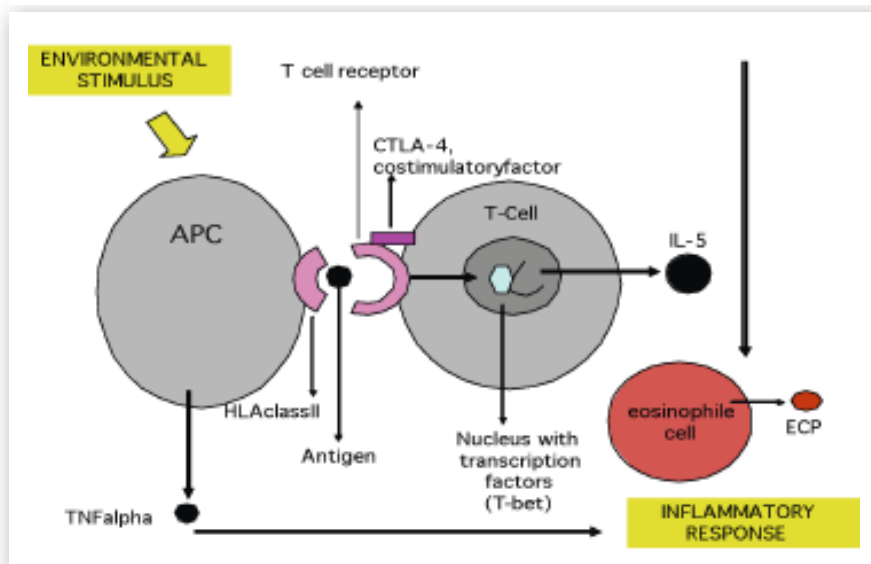
Hvor stor er effekten av en gitt genetisk variasjon?

Det at man finner en sterk assosiasjon mellom en genvariant og en fenotype, sier noe om sikkerheten for at det er en sammenheng, men ikke noe om hvor stor effekt genvarianten har på fenotypen. Våre funn tyder på sikre assosiasjoner mellom de studerte genvariantene og astma- og/eller allergifenyotyper, men størrelsen av effekten hver av disse genene har på astma- eller allergifenyotyper er liten når vi videre måler «risk» eller «odds ratioer». Med dette mener jeg at en person med en av disse genvariantene vil kun ha en liten økt risiko for utvikling av astma og/eller allergi. Dette er i samråd med andre astmagenetikstudier. Initialt trodde man at det fantes en eller noen få gener som kunne forklare astmasykdommen. Etter hvert innså man at det var flere genetiske områder som var involvert, jf. de første koblingsstudiene. Man gikk derfor over til hypotesen om at astma er en oligogenetisk sykdom, dvs. at flere gener med moderat effekt sammen medfører økt risiko for astma (16). De siste årenes mange astmagenetikstudier, inkludert våre, taler for at det ikke bare er mange genetiske områder involvert, men at det innen hvert område kan være mange forskjellige gener som hver for seg bidrar med mye mindre effekter en man tidligere antok. Astma ansees nå som en polygenetisk sykdom hvor mange gener hver med liten effekt er involvert (17).

Hvilke aspekter er under genetisk påvirkning?

Det vi observerte i våre studier var at de forskjellige genene var assosiert til forskjellige aspekter ved astma og allergi. Mens TNF-genet viste klar assosiasjon til ikke-allergisk astma og ikke allergier,

FIGUR 1. Astmagenetik-prosjektet ved Miljø og Barneastma-gruppen, Ullevål Universitetssykehus. Figuren illustrerer hva gruppen pr dags dato har analysert og undersøkt (sirklet i blått) i forhold til astma- og allergifenyotyper.



var T-bet-genet helt tydelig assosiert med *allergisk astma*. HLA klasse II-genene var assosiert med *spesifikke allergier* (bjørk, burot og katt) men ikke med astma, mens CTLA-4-genet var assosiert med *atopisk astma* (astma med forhøyet IgE), og ECP-genet med *generell astma* og ECP-nivåer. Disse observasjonene henleder direkte til debatten om astmaetiologi. Er «astma»-begrepet slik vi bruker det i dag en sykdom og disposisjon med mange forskjellige presentasjonsformer, eller er det sekkebetegnelse på forskjellige syndromer med forskjellig genetisk og patologisk etiologi? Våre funn kan jo tale for det sistnevnte, hvor det kan virke som om forskjellige gener disponerer for forskjellige former for astma. Interessant er det i hvert fall at astma, som tradisjonelt har vært inndelt etter presentasjonsform (f.eks anstrengelsesutløst astma, allergisk astma etc), muligens også etter hvert kan inndeles i genetisk-immunologiske grupper i samråd med økende genetisk og immunologisk kunnskap?

Er våre funn i samråd med andre studier? Her er svaret et enkelt *nei, ikke alltid*. Det er tilsynelatende motstridene resultater mellom enkelte av våre funn og andre studier. Når det gjelder TNF-varianter, viser det seg at mens flere studier støtter våre funn, er det andre studier som finner assosiasjon mellom astma og den motsatte TNF-varianten. Når det gjelder T-bet, er det også flere studier som ikke detekterer noen assosiasjoner til astmafenotyper i det hele tatt. Videre fant vi i CTLA-4-studien at assosiasjonene våre var mye sterkere i noen populasjoner (for eksempel Groningen i Nederland) enn i den norske populasjonen. Det som kanskje er oppsiktsvekkende er at disse typer motstridende resultater dessverre ikke er unike innen astmagenetikk-forskningen, med derimot heller trenden: For nesten hver eneste assosiasjonsstudie finnes det andre studier med motstridende resultater. Dette fenomenet har tvunget fram alternative forståelser av samspill mellom gener, miljø og sykdom, noe Martinez diskuterer inngående i sin artikkel i dette nummeret av Allergi i Praksis. Er det kanskje sånn at genene våre ikke oppfører seg kategorisk, men faktisk blir avlest, transkribert og translateret til proteiner avhengig av hvilket miljø de befinner seg i? I så fall blir skille «nature versus nurture» mer komplisert enn noen gang før!



Astmagenetikk-prosjektet ved Ullevål Universitetssykehus er del av den store Miljø og Barneastma-studien som har fulgt friske barn født i 1992/1993 ved Aker og Ullevål sykehus fram til i dag. Resultater fra observasjonene viser at ulike gener er assosiert til forskjellige aspekter ved astma og allergi. FOTO: STEINAR NYHR/NN/SAMFOTO

Klinisk betydning?

Multiple gener hver med liten effekt, en klinisk tilstand som kanskje egentlig er utrykk for mange forskjellige genetisk-immunologiske tilstander, miljø- og geninteraksjoner i utviklingen av sykdom; Hvordan kan alt dette sammenfattes til å være av betydning for oss som jobber i den kliniske hverdagen med astma og allergi?

Diagnostikk:

Et hyppig stilt spørsmål er om økt astmagenetikk-kunnskap vil kunne bidra til identifisering av mennesker med økt risiko for astma, eller bedre tidlig diagnostikk av astma. Som kjent er dette en stor utfordring i barnepopulasjonen, hvor barna er for unge til å blåse spirometri og hvor skille mellom bronkiolitter og astma er ekstremt vanskelig. Som diskutert over, er det sannsynligvis mange gener som under spesifikke miljøforutsetninger hver kan bidra til en liten økning i risiko for utvikling av en av flere astmatiske disposisjoner. I tillegg må det tas med i betraktningen at astma er blant de vanligste kroniske sykdommer i befolkningen og at de genetiske variantene som disponerer for sykdom, derfor sannsynligvis også er vanlige i befolkningen. På dette grunnlag syntes jeg det er vanskelig å se at genotyping pr dags dato kan brukes til identifikasjon av risikoindivider (screening) eller diagnostisering av astma.

Oppfølging:

Selv om astma defineres som en eller flere forskjellige tilstander, er det bred enighet om at personer med astma har forskjellig sykdomsforløp og prognose. All behandling av astma må derfor til en

viss grad individualiseres, og personens eventuelle allergier, aktivitetsnivå og andre symptomer vil måtte inngå i en terapeutisk vurdering. Muligheten genetikken kan gi oss til å klassifisere subtyper av immunologiske reaksjoner, kan i dette øyemed spille en viktig rolle. Økende kunnskap om forskjellige genetiske profiler og gen-miljø-interaksjoner kan potensielt bidra til vesentlig bedre veiledning og forebyggende behandling på individuelt nivå. Et eksempel på dette er CD14-genet. Det har allerede vært vist at samme genetiske variant av CD14-genet kan enten beskytte eller disponere for utvikling av astma avhengig av om man hadde husdyr eller bodde på gård (18). Tatt i betraktning hvor ofte man står overfor astmabarn som ønsker seg katt, hund eller kanin, er det ikke vanskelig å se hvordan slike genetiske profiler ville kunne være til nytte i forebyggende veiledning.

Behandling:

Siden mange av de identifiserte astmagenene er gener som koder for produkter i vårt immunsystem, knytter det seg naturligvis stor skepsis til genterapi (endring eller introduksjonen av gener) i den forstand at dette vil kunne ha ringvirkninger på hele immunsystemet vårt. Denne fine interne balansen ser vi allerede i CTLA-4-forskningen, hvor den ene hovedvarianten av CTLA-4 som disponerte for astma, faktisk viste seg å være beskyttede for autoimmune sykdommer, og motsatt (11). På den andre siden har vår underliggende genetikk sannsynligvis stor betydning for hvorfor vi som individer responderer forskjellig på medisiner. Det har vært studier som viser at opp til 50% av astmapasien-

ter ikke responderer optimalt på standard behandling vi kan tilby i dag, og at en stor andel av dette kan skyldes genetiske disposisjoner (19). Her ligger det derfor et stort potensial for identifikasjon av respondere og ikke-respondere, og derved en basis for medikamentvalg på genetisk grunnlag. I tillegg har astmagenetikken bidrag til økt forståelse av underliggende immunologi og inflammasjon dannet grunnlag for utprøving av alternative medisiner. Det er ikke lenge siden TNF-behandling hos alvorlige astmatikere var utprøvd (2005), og resultatet var en signifikant bedring i både astmasymptomer, bronkial hyperreaktivitet og lungesjonsparametre (20).

Oppsummering

Astmagenetik er et fagfelt som har utviklet seg enormt raskt i løp av bare de siste årene, ikke minst på grunn av den teknologiske utviklingen innenfor genetikkfaget. Likevel har genetikken ikke gitt oss svaret på «astma»-sykdommen. I stedet for å avdekke de «viktigste» astmagenene, finner man at mange flere gener enn tidligere antatt, hver med liten effekt og i samråd med miljøfaktorer, påvirker utviklingen av astma. Imidlertid har det langs denne forskningsveien blitt avdekket ny kunns-

skap om kompleksiteten i vårt immunsystem og astmainflammasjonen. Det blir spennende å se hvor vidt man kan bruke denne kunnskapen til å klassifisere, og dermed bedre behandling og symptomkontroll hos den individuelle astmapasient.

Referanser

1. Los H, Postmus PE, Boomsma DI. Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies. *Twin Res* 2001 Apr; 4(2): 81–93.
2. Edfors-Lubs ML. Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergol* 1971 Aug; 26(4): 249–85.
3. Harris JR, Magnus P, Samuelsen SO, Tambs K. No evidence for effects of family environment on asthma. A retrospective study of Norwegian twins. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 Jul; 156(1): 43–9.
4. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001 Feb 16; 291(5507): 1304–51.
5. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001 Feb 15; 409(6822): 928–33.
6. Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, et al. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 1996 Sep 19; 383(6597): 247–50.
7. Ober C. Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J Allergy Clin Immunol* 2005 Aug; 116(2): 274–8.
8. Kim JJ, Kim HH, Park JH, Ryu HJ, Kim J, Moon S, et al. Large-scale identification and characterization of genetic variants in asthma candidate genes. *Immunogenetics* 2005 Oct; 57(9): 636–43.
9. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* 2006 Mar; 7(2): 95–100.
10. Carlsen KC, Haland G, Devalapalli CS, Munthe-Kaas M, Pettersen M, Granum B, et al. «Asthma in every fifth child in Oslo, Norway: a 10-year follow up of a birth cohort study». *Allergy* 2006 Apr; 61(4): 454–60.
11. Munthe-Kaas MC, Carlsen KH, Helms PJ, Gerritsen J, Whyte M, Feijen M, et al. CTLA-4 polymorphisms in allergy and asthma and the TH1/TH2 paradigm. *J Allergy Clin Immunol* 2004 Aug; 114(2): 280–7.
12. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003 Apr 30.
13. Munthe-Kaas. HLA DR-DQ haplotypes and the TNF alpha-308 polymorphism; associations with asthma and specific allergies. *Allergy* Accepted. 2007. Ref Type: Generic
14. Munthe-Kaas. T-bet haplotype found associated with allergic asthma in children. *J Allergy Clin Immunol*. Accepted. 2007. Ref Type: Generic
15. Munthe-Kaas MC, Gerritsen J, Carlsen KH, Undlien D, Egeland T, Skinningsrud B, et al. Eosinophil cationic protein (ECP) polymorphisms and association with asthma, s-ECP levels and related phenotypes. *Allergy* 2007 Apr; 62(4): 429–36.
16. Cookson W. Genetics and genomics of asthma and allergic diseases. *Immunol Rev* 2002 Dec; 190: 195–206.
17. Martinez FD. Genes, environments, development and asthma: a reappraisal. *Eur Respir J* 2007 Jan; 29(1): 179–84.
18. Eder W, Klimecki W, Yu L, von ME, Riedler J, Braun-Fahrlander C, et al. Opposite effects of CD 14/-260 on serum IgE levels in children raised in different environments. *J Allergy Clin Immunol* 2005 Sep; 116(3): 601–7.
19. Weiss ST, Litonjua AA, Lange C, Lazarus R, Liggett SB, Bleeker ER, et al. Overview of the pharmacogenetics of asthma treatment. *Pharmacogenomics* 2006 Sep; 6(5): 311–26.
20. Howarth PH, Babu KS, Arshad HS, Lau L, Buckley M, McConnell W, et al. Tumour necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax* 2005 Dec; 60(12): 1012–8.