

TRIDIMENZIONALNA ULTRAZVOČNA PREISKAVA V OFTALMOLOGIJI – PRVE IZKUŠNJE PRI RAZLIČNIH OČESNIH BOLEZNIH

THREE-DIMENSIONAL ULTRASOUND EXAMINATION IN OPHTHALMOLOGY – INITIAL
EXPERIENCE IN VARIOUS EYE DISEASE

Dušica Pahor

Oddelek za očne bolezni, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Prispelo 2003-06-27, sprejeto 2003-07-21; ZDRAV VESTN 2003; 72: Supl. III: 31-4

Ključne besede: oftalmološka ultrasonografija; tridimenzionalna ultrasonografija; oftalmologija; ultrasonografija,

Izvleček – Izhodišča. Uporaba tridimenzionalne ultrazvočne preiskave (3D UZ) v oftalmologiji predstavlja pri nas novo klinično preiskavo, ki nam daje dodatne možnosti UZ diagnostike. V naslednjem prispevku želimo prikazati uporabo 3D UZ preiskave v oftalmologiji pri različnih boleznih in prikazati prednosti in pomanjkljivosti te metode v primerjavi s standardizirano ultrasonografijo.

Bolniki in metode. V prispevku je zajetih 12 bolnikov, ki so bili hospitalizirani na Oddelku za očne bolezni Splošne bolnišnice Maribor v obdobju od decembra 2002 do marca 2003, in pri katerih je bila poleg standardizirane ultrasonografije (2D UZ) narejena še 3D UZ preiskava. Preiskavo smo opravili pri bolniku z malignim melanomom žilnice, eksudativno makulopatijo, subhorioidalno krvavitvijo, ftizi zrkla po poškodbi, pri okvari vidnega živca po poškodbi, retrobulbar nem nevritisu, pri dveh bolnikih zaradi krvavitve v steklovino, pri dveh bolnikih zaradi uveitisa in pri dveh bolnikih zaradi odstopa mrežnice.

Rezultati. Pri vseh bolnikih smo s standardizirano ultrasonografijo (2D UZ) potrdili ali postavili diagnozo ter nato pri vseh naredili še 3D UZ preiskavo. Pri bolnikih z eksudativno makulopatijo in odstopom mrežnice nismo našli prednosti te metode glede na standardizirano 2D UZ preiskavo, enako tudi ne pri obeh bolnikih z boleznijo in poškodbo vidnega živca. Pri dveh bolnikih s krvavitvijo v notranjost očesa, pri dveh bolnikih z uveitisom in pri bolniku s subhorioidalno krvavitvijo so bile spremembe bolj vidne s 3D metodo. Prednost 3D UZ metode je bila pri bolniku z malignim melanomom žilnice, kjer smo lahko natančno določili umestitev, velikost in prostornino tumorja. Tudi v primeru ftize zrkla po poškodbi smo s 3D UZ metodo natančno določili velikost in prostornino zrkla in lažje ugotovili porušeno strukturo v njegovi notranjosti.

Zaključki. 3D UZ metoda nam daje možnosti natančnega določanja tridimenzionalnih struktur. Naše prve izkušnje s 3D UZ metodo v oftalmologiji kažejo na njeno prednost pri določanju lokacije, velikosti in prostornine posameznih sprememb, kot so intraokularni tumorji in za določanje volumna in strukture očesa po poškodbi, kot je ftiza zrkla. Seveda je potrebno večje število preiskovancev, da bomo naše ugotovitve lahko potrdili.

Key words: ophthalmic ultrasonography; 3D ultrasonography; ophthalmology; ultrasonography

Abstract – Background. The use of three-dimensional (3D) ultrasonography in ophthalmology presents in our country a new clinical investigation, which give us a new ultrasound diagnostic possibilities in this field. The aim of this contribution was to present the use of 3D ultrasound examination in various ocular diseases and to find out advantages and disadvantages of this method in comparison with standard ultrasonography.

Patients and methods. Twelve patients hospitalized at Department of Ophthalmology in Teaching Hospital Maribor were selected for 3D ultrasound examination in addition to 2D ultrasonography between December 2002 and March 2003. The examination was performed in patient with choroidal melanoma, exudative maculopathy, subchoroidal haemorrhage, retinal detachment, phthisis of the eye after injury, optic nerve trauma, retrobulbar neuritis, in 2 patients with vitreous haemorrhages, in 2 patients with uveitis and in 2 patients with retinal detachment.

Results. In all patients after standardized ultrasonography (2D), which already confirmed or determined the diagnosis, 3D ultrasonography was performed. In patients with exudative maculopathy and retinal detachment we found no advantages with this method. The same findings were also in patient with optic nerve disease and optic nerve trauma. In patient with vitreous haemorrhage and in patient with subchoroidal haemorrhage the changes were more evident with 3D ultrasonography. The real advantage of 3D ultrasonography was in patient with choroidal melanoma, where measurements of tumor height, volume and determination of tumor localisation were more accurate.

Conclusions. 3D ultrasonography allows the precise assessment of three-dimensional structures. Our experiences with 3D ultrasonography in ophthalmology suggest advantages of this method for measurement of length, area and volume of ocular tumors, particularly malignant melanoma and for evaluation of structure, length and volume of traumatized eye, such is phthisis. A further study with larger number of patients is necessary to confirm our findings.

Uvod

Ultrazvočna (UZ) preiskovalna metoda se v oftalmologiji uporablja že od leta 1956 (Mundt in Huges). V zadnjih 15 letih je ostala kot standardizirana oftalmološka kontaktna dvodimenzionalna (2D) UZ preiskava praktično nespremenjena (1). Standardizirana oftalmološka 2D UZ preiskava nam služi za prikaz celotnega zrkla in posameznih struktur orbite. Uporablja se UZ sonda s frekvenco 8–10 MHz (2, 3). V oftalmologiji je linearni prikaz še vedno zelo pomemben, saj nam daje natančne biometrične podatke. Obe metodi zahtevata izkušenega preiskovalca.

V zadnjih letih se je na različnih področjih medicine začela uveljavljati 3D UZ preiskava, ki je največjo odmevnost dosegla na področju ginekološko prenatalne diagnostike. Trenutno je malo prispevkov o uporabi 3D UZ preiskave v oftalmologiji. 3D prikaz nastane iz UZ podatkov, dobljenih iz serij 2D slik. Prikaz 3D slike je možen zaradi uporabe računalniškega programa za prostorsko upodabljanje. Prve eksperimentalne raziskave o določanju prostornine intraokularnih tumorjev s 3D UZ preiskavo so izvedli v letih 1987 do 1988. Potrdili so, da s to metodo lahko določimo dolžino, višino in prostornino tridimenzionalnih struktur (4–8). Downey s sod. je l. 1996 opisal 3D UZ prikaz pri 5 bolnikih (4).

Kljub temu je število prispevkov s tega področja še vedno omejeno, tako da 3D UZ preiskovalna metoda v oftalmologiji še nima natančno določene vloge (9–11).

Leta 1990 je bila v oftalmologijo uvedena UZ biomikroskopija za pregled sprednjih delov zrkla, ki uporablja visoko frekvenco 50 MHz (12, 13). Leta 1996 je Iezzi s sodelavci opisal 3D UZ biomikroskopijo, ki nam nazorneje prikaže prostorske strukture v sprednjem segmentu (14). Opisani so posamezni primeri uporabe 3D UZ biomikroskopije sprednjega segmenta (9, 15, 16).

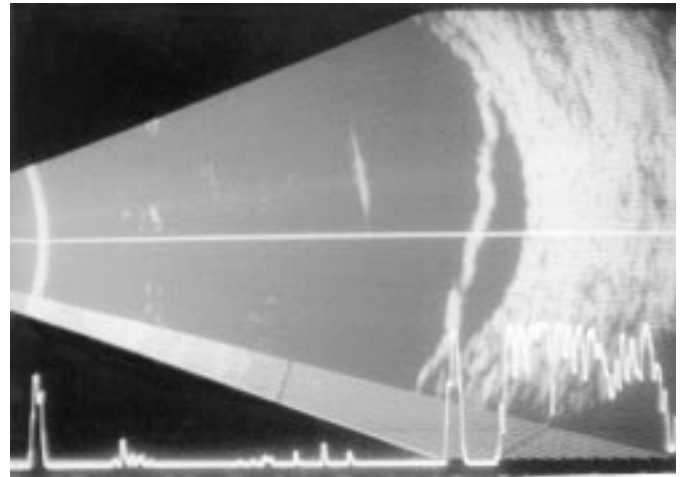
V naslednjem prispevku želimo prikazati uporabo 3D UZ preiskave v oftalmologiji pri različnih boleznih in stanjih po poškodbah in ugotoviti prednosti in pomanjkljivosti te metode v primerjavi s standardizirano 2D UZ preiskavo.

Bolniki in metode

V raziskavo je bilo zajetih 12 bolnikov z različnimi očesnimi boleznimi, pri katerih je bila opravljena 3D UZ preiskava. Vsi bolniki so bili hospitalizirani na Oddelku za očne bolezni Splošne bolnišnice Maribor v obdobju od decembra 2002 do marca 2003. Pri vseh bolnikih je bila najprej narejena standardizirana 2D UZ preiskava (Ophthascan S). V raziskavo so bili vključeni: bolnik z eksudativno makulopatijo, dva bolnika z odstopom mrežnice, dva bolnika s prizadetostjo vidnega živca – stanje po udarcu zrkla z edemom vidnega živca in retrobulbarnim nevrinitisom, dva bolnika s krvavitvijo v steklovino, dva bolnika z uveitisom, en bolnik s subhoroidalno krvavitvijo, en bolnik z malignim melanomom žilnice in en bolnik s ftizo zrkla po poškodbi.

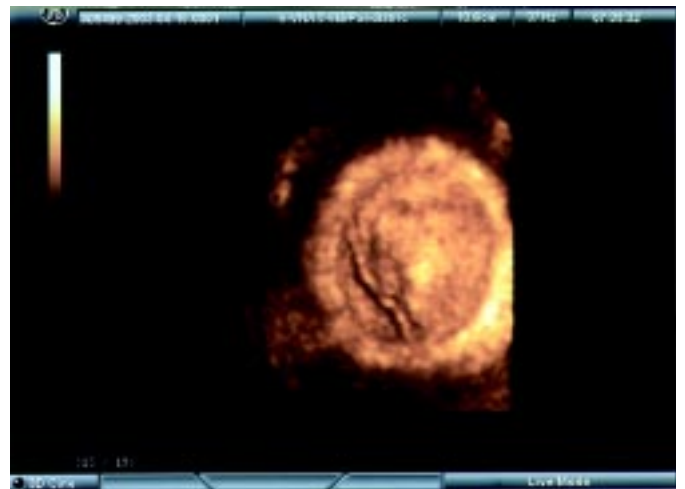
3D UZ preiskavo smo opravili z UZ napravo VOLUSCON 530 D Kretz, ki nam omogoča avtomatizirano premikanje UZ snopa. Da dobimo 3D UZ sliko, je potrebna kontaktna oftalmološka UZ B sonda, ki se položi na preiskovančeve zaprte veke. Kot vezno snov uporabljamo 1-odstotno raztopino metilceluloze, ki jo damo na zaprto večo. Ko dobimo na ekranu centralno ležeče opazovano področje, sprožimo avtomatično premikanje UZ snopa. Pri tem nastanejo številne 2D slike, ki se zberejo in shranijo prek mikroročunalnika. Za boljši prikaz rezultatov je pomembno, da držimo sondo čim bolj mirno in da preiskovanec ne premika zrkla.

Po opisanim »prostorskem skeniranju« sledi večravninski prikaz, ko se dobljene 2D slike zberejo in razporedijo v tri druga drugo pravokotno ležeče ravnine (X, Y, Z – aksialno, frontalno in sagitalno). Sečišče vseh treh osi je središče vrtenja. V



Sl. 1a. Odstop mrežnice zaradi raztrganine, prikazan s standardizirano 2D UZ metodo v zgornjem temporalnem kvadrantu desnega zrkla.

Figure 1a. Rhegmatogenous retinal detachment is shown with standardized 2D ultrasound method in the upper temporal part of the right eye.



Sl. 1b. Prikaz odstopa mrežnice zaradi raztrganine s tridimenzionalno UZ metodo.

Figure 1b. Three-dimensional display of retinal detachment.

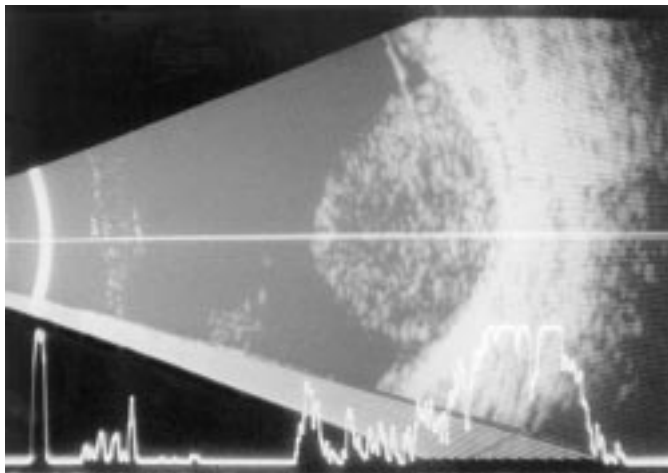
vsaki izmed teh ravnin lahko posamezne 2D ehograme pomikamo v katerokoli smer znotraj posameznega prostora. Sledi 3D oblikovanje prostora, ki je računalniška obdelava tridimenzionalnega prikaza posnetega prostora z možnostjo prikaza v barvni sliki.

Rezultati

Pri vseh 12 primerih so rezultati preiskave s 3D UZ metodo korelirali s standardizirano 2D UZ preiskavo. Vse spremembe, vidne na standardizirani UZ 2D preiskavi, so bile zaznane tudi s 3D UZ preiskavo.

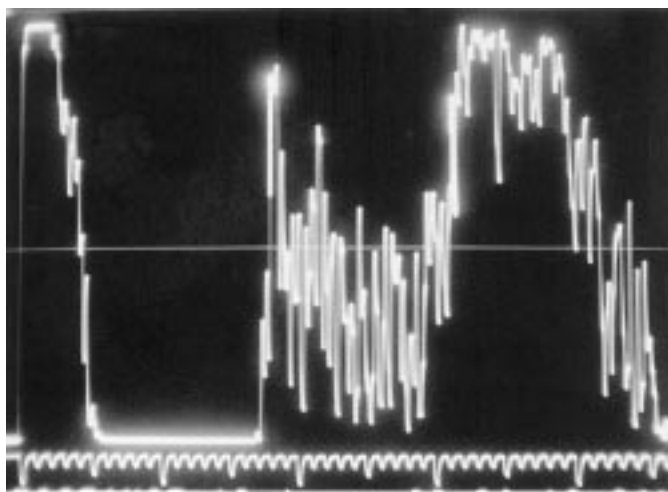
2D UZ preiskavo, s katero smo že potrdili ali postavili diagnozo, smo opravili pred 3D preiskavo. Med obema preiskavama bolniki niso navajali nobene neprijetnosti.

Pri nekaterih je bilo potrebno zaradi gibanja bolnika ali premika roke preiskovanca ponoviti »prostorsko skeniranje«.



Sl. 2a. Prikaz velikega primarnega malignega melanoma žilnice kupolaste oblike s standardizirano 2D UZ metodo v nazalni polovici desnega zrkla s spremljajočim sekundarnim odstopom mrežnice. Mrežnica, ki pokriva tumor, nalega, mrežnica okoli tumorja je dvignjena.

Figure 2a. B-scan image of a large »dome-shape« configuration of a primary chorioidal melanoma in the nasal part of the right eye associated with secondary retinal detachment. The overlying retina is attached to the tumor and is detached in the adjacent areas.

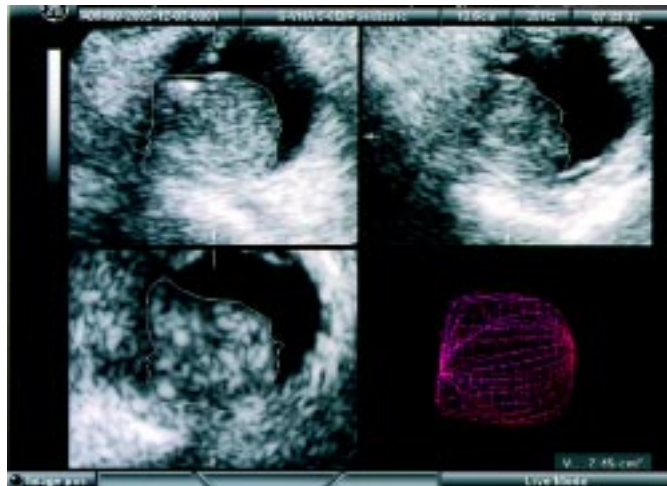


Sl. 2b. Linearni prikaz primarnega malignega melanoma žilnice z značilno ultrazvočno sliko, kot je regularna zvočna struktura in nizka do srednje visoka notranja reflektivnost.

Figure 2b. A-scan image of primary chorioidal melanoma with typical ultrasound pattern such are regular acoustic structure and low to medium internal reflectivity.

Pri bolniku z eksudativno makulopatijo so bile minimalne spremembe v enaki meri zaznavne z 2D kakor s 3D UZ metodo. Pri dveh bolnikih z regmatogenim odstopom mrežnice je bil ta dobro viden in umeščen z obema metodama. V obeh primerih je bilo možno ugotavljati gibljivost membrane le z 2D kinetično UZ preiskavo (sl. 1a, sl. 1b).

Pri bolniku z retrolbularnim nevrítisom smo z 2D metodo izmerili debelino vidnega živca, in sicer z linearnim 1D prikazom (A sonda). 3D UZ metoda nam ni dodala novih podatkov. Enako je bilo pri bolniku s postravmatskim edemom vidnega živca.



Sl. 2c. Tridimenzionalni prikaz primarnega malignega melanoma žilnice v različnih ravninah (X, Y in Z ravnina), ki so druga na drugo pravokotne. Označene so meje tumorja. Omejena področja na vsaki sliki se seštejejo in pomnožijo z razdaljo med njimi, da dobimo celotno prostornino.

Figure 2c. Display of primary chorioidal melanoma using three-dimensional ultrasound in different planes (X, Y and Z plane) perpendicular one to each other. Tumor boundaries have been delineated. The areas of the bounded region in each scan are added and multiplied by interslice distance to determine total volume.

Pri obeh bolnikih s krvavitvijo v steklovino kakor pri obeh bolnikih z uveitisom so bile spremembe vidne z obema metodama, vendar je bil prikaz lokalizacije in obsega motnejav v steklovini tako krvavitve kakor vnetja nazorneje prikazan s 3D metodo. Še posebej je bila ta prednost očitna pri HIV-pozitivnem bolniku s panuveitisom, kjer je bila zaradi močnega vnetja ocena sprememb v steklovini s številnimi ciklitičnimi membranami lažja s 3D metodo.

Podobni rezultati so bili pri bolniku s subhoroidalno krvavitvijo po antiglavkomski operaciji. S 3D metodo je bil jasneje prikazan obseg in prostornina same krvavitve.

Pri bolniku z malignim melanomom žilnice je bila diagnoza že postavljena z 2D UZ metodo. S 3D UZ metodo smo lažje določili umeščenost tumorja, posebno še lego tumorja glede na druge strukture v zrklu in glede na vidni živec. Lažje smo izmerili velikost tumorja in njegov volumen (sl. 2a, sl. 2b, sl. 2c).

Podobno je bilo pri bolniku s ftizo zrkla po poškodbi, kjer je bila očitna prednost 3D UZ metode pri ugotavljanju porušene strukture v notranjosti zrkla in določitev volumna zrkla v primerjavi z zdravim zrklo.

V obeh zadnjih primerih je bila narejena enukleacija zrkla, v prvem primeru zaradi obsežnosti samega tumorja in v drugem zaradi bolečin v slepem atrofičnem zrklu.

Razpravljanje

Oftalmološka 2D UZ preiskava se je v zadnjih letih minimalno spremenila (5, 17). V zadnjih 13 letih pa je naraslo zanimanje za 3D UZ preiskavo, zlasti pri merjenju prostornine tumorjev (7, 18).

Standardizirano 2D UZ preiskavo je običajno izvedemo v antero-posteriorni smeri, ali v prečni, aksialni ali longitudinalni smeri, lahko vzporedno ali rahlo poševno. Nekatere spremembe lahko zaznamo le z medialne ali lateralne smeri ali poševno, kar pa z običajnim 2D UZ prikazom včasih ni možno.

Celotna 3D UZ preiskava je kratka, zbiranje podatkov traja nekaj sekund. Ta nov sistem omogoča, da lahko preiskovalec porabi več časa za analiziranje slike kot pri standardizirani 2D UZ preiskavi. 3D UZ preiskava omogoča hitro skeniranje številnih 2D slik, ki se shranijo. Posebni računalniški program pa nato te informacije preoblikuje v 3D sliko. Sposobnost shranjevanja omogoča ponovitev pregleda (4, 5). Slike, dobljene pri preiskavi, so digitalne in se lahko prenašajo po digitalni pošti, kar omogoča konzultacijo in diskusijo z drugimi centri.

3D UZ metoda omogoča boljši celostni prikaz orbitalnih struktur, še zlasti kadar gre za anatomske posebnosti, bolj natančno umeščeno in merjenje teh sprememb (19). Omogoča nam retrospektivno gledanje pod različnimi koti in smermi. Coleman je ugotovil, da je 3D UZ preiskava pomembna za ugotavljanje medsebojne lege orbitalnih struktur, še posebej v odnosu do zrkla (15). Pri tumorjih orbite je ta odnos še posebej pomemben (5). Med našimi bolniki ni bilo primera z orbitalno patologijo, razen okvar vidnega živca. Prepričani pa smo, da bi bila 3D UZ metoda zelo pomembna pri diagnostiki tumorjev vidnega živca, ki je s standardizirano 2D UZ metodo zelo težka tudi v rokah izkušenega preiskovalca.

Določitev volumna tumorja je najpomembnejši dejavnik v prognozi in zdravljenju očesnih tumorjev, zlasti malignega melanoma žilnice. 3D omogoča natančno določitev volumna, zlasti še pri tumorjih, ki so nepravilne oblike (9). Dosedanji UZ standard za merjenje intraokularnih tumorjev je temeljil na določanju maksimalne višine tumorja in maksimalne širine. Volumen tumorja se je nato izračunal z različnimi formulami (20). Grasbon s sodelavci je ugotovil, da pri določanju volumna kupolaste spremembe s 3D UZ metodo v primerjavi s klasičnim izračunom ni bilo pomembne razlike. Odstopanja so bila v posameznih primerih od 4–16% (21). Prednosti 3D UZ metode so zlasti pri določitvi lokalizacije in možnosti prikaza 3D slike z različnih smeri. Omogoča nam merjenje velikosti in volumna z visoko mero zanesljivosti (8). Pri ponovnem merjenju so bila odstopanja največ 5% (18). 3D UZ metoda je pomembna za spremljanje tumorja po obsevanju kot ocenitev uspešnosti terapije. Preiskavo naredi oftalmolog sam, kar je zelo pomembno. Dobljeni rezultati s 3D preiskavo so primerljivi z magnetno resonanco, ki nam prav tako da prostorsko informacijo, vendar ima nekatere slabosti (21). Traja dlje časa in ima sorazmerno nizko resolucijo. 3D UZ metoda je pomembna za natančno določitev položaja episkleralne plombe pri brahiterapiji pri malignih melanomih žilnice (12).

Podobno vlogo kot pri določanju volumna tumorja ima tudi pri določanju volumna zrkla. To je pomembno za stanja po poškodbah z zmanjšanjem zrkla in porušeno notranjo strukturo, kot je to pri ftizi zrkla. V našem primeru je bila prostornina poškodovanega zrkla 2,76 mm³, zdravega pa 6,11 mm³. V primeru subhorioidalne krvavitve nam je 3D preiskava omogočila boljšo določitev obsega krvavitve. To je važno zaradi morebitne načrtovane operacije, zlasti določitve področja dreniranja.

3D UZ preiskava ni kinetična in je kot taka manj primerna za ugotavljanje dinamičnih elementov oziroma gibljivosti struktur na vitreoretinalni površini pri boleznih, kot je proliferativna vitreoretinopatija ali trakcijski odstop mrežnice. V teh primerih dajemo prednost 2D UZ preiskavi (6).

Ker temelji na kontaktni 2D sliki, so omejitve in artefakti podobni kot pri standardizirani 2D UZ preiskavi. Obe tehniki imata omejitve pri prikazu robov tumorja, tumorjev v srednjih delih zrkla, pri velikih tumorjih in pri globoko ležečih orbitalnih tumorjih.

Tudi položaj UZ snopa ni zmeraj pravokoten na preiskovano področje, zlasti ne pri preiskavah v srednjem delu zrkla.

Slabost sistema je, da ne more prikazati celotnega zrkla z enim skeniranjem, tako da so spremembe v srednjem delu zrkla delno vidne ali zgrešene.

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da predstavlja 3D UZ preiskava pomemben prispevek v UZ diagnostiki zrkla in orbite in ima že sedaj pomembno mesto pri določanju prostornine tumorjev in njegovi umestitvi. Potrebne pa so še nadaljnje raziskave in zaključki, da bo tudi ta metoda dobila ustrezno mesto v oftalmološki diagnostiki. Metoda ne more nadomestiti standardizirane oftalmološke UZ preiskave, vendar lahko v nekaterih primerih bistveno prispeva k diagnostiki, predoperativnemu načrtovanju in spremljanju po posegu. Potrebne so še nadaljnje preiskave v smislu nadomestitve MRI preiskave s 3D UZ metodo kot enostavnejše in cenejše metode.

Zahvala

Zahvaljujem se prim. Igorju Japlju, dr. med, Oddelek za perinatologijo Splošne bolnišnice Maribor za izredno spodbudo pri začetnih preiskavah in ing. Stanku Pšeničniku z Oddelka za biomedicinsko tehniko Splošne bolnišnice Maribor.

Literatura

- Mundt GH, Hughes WS. Ultrasonics in ocular diagnosis. *Am J Ophthalmol* 1956; 41: 488–8.
- Ossoinig KC. Echography of the eye. In: Arger PH. *Regiology of the orbit*. New York: Wiley & Sons, 1976.
- Guthoff R. *Ultraschall in der ophthalmologischen Diagnostik*. Ein Leitfaden für die Praxis. Stuttgart: Enke, 1988.
- Downey DB, Nicolle DA, Levin MF, Fenster A. Three-dimensional ultrasound imaging of the eye. *Eye* 1996; 10: 75–81.
- Coleman DJ, Silverman RH, Rondeau MJ, Lizzi FL. New perspectives: 3-D volume rendering of ocular tumors. *Acta Ophthalmol* 1992; 70: Suppl 204: 22–2.
- Jensen PK. Ultrasonographic three-dimensional scanning for determination of intraocular tumor volume. *Acta Ophthalmol* 1992; 70: Suppl 204: 23–5.
- Jensen PK, Hansen MK. Ultrasonographic three-dimensional scanning for determination of intraocular tumor volume. *Acta Ophthalmol* 1991; 69: 178–86.
- Fisher Y, Hanutsaha P, Tong S, Fenster A, Mazarin G, Mandava N. Three-dimensional ophthalmic contact B-scan ultrasonography of posterior segment. *Retina* 1998; 18: 251–6.
- Cusumano A, Coleman DJ, Silverman RH et al. Three-dimensional ultrasound imaging – clinical applications. *Ophthalmology* 1998; 105: 300–6.
- Finger PT, Romero JM, Rosen RB, Iezzi R, Emery R, Berson A. Three-dimensional ultrasonography of chorioidal melanoma: localization of radioactive eye plaques. *Arch ophthalmol* 1998; 116: 305–12.
- Romero JM, Finger PT, Iezzi R, Rosen RB, Cocker RS. Three-dimensional ultrasonography of chorioidal melanoma: extrascleral extension. *Am J Ophthalmol* 1998; 126: 842–4.
- Pavlin CJ, Sherar MD, Foster FS. Subsurface ultrasound microscopic imaging of the intact eye. *Ophthalmology* 1990; 97: 244–50.
- Pavlin CJ, Harasiewicz K, Sherar MD, Foster FS. Clinical use of ultrasound biomicroscopy. *Ophthalmology* 1991; 98: 287–95.
- Iezzi R, Rosen RB, Tello C, Liebmann J, Walsh JB, Ritch R. Personal computer-based 3-dimensional ultrasound biomicroscopy of the anterior segment. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 520–4.
- Coleman DJ. Evaluation of ciliary body detachment in hypotony. *Retina* 1995; 15: 312–8.
- Silvermann RH, Rondeau MU, Lizzi FL, Coleman DJ. Three-dimensional high-frequency ultrasonic parameter imaging of anterior segment pathology. *Ophthalmology* 1995; 192: 837–43.
- Shammas HJ. *Ophthalmic ultrasonography and biometry*. St. Louis, Toronto: Mosby Company, 1984.
- Silvermann RH, Coleman DJ, Rondeau MJ, Woods SM, Lizzi FL. Measurement of ocular tumor volumes from serial, cross-sectional ultrasound scans. *Retina* 1993; 13: 69–74.
- Delcker A, Martin T, Tegeler C. Magnetic sensor data acquisition for three-dimensional ultrasound of the orbit. *Eye* 1998; 12: 725–8.
- Guthoff R. *Modellmessungen zur Volumenbestimmung des malignen Aderhautmelanoms*. Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 1980; 214: 139–46.
- Grasbon T, Schriever JP, Hoops JP, Mueller. AJ. 3D-Ultraschall. Erste Erfahrungen bei verschiedenen Augenerkrankungen. *Ophthalmologie* 2001; 98: 88–93.