

# Antioxidanten bij radiotherapie

## Een literatuuronderzoek naar de invloed van hoge doseringen antioxidant op de effectiviteit en op de bijwerkingen van radiotherapie

*Agnetha Hofhuis\*, Annemarie L. Zuur\*, Caroline J.G. Panis\*\*, Dr.ir. Peter J.M. Weijs\*\*, Ir. Hinke M. Kruijenga\*\**

### Inleiding

Diëtisten die op een afdeling radiotherapie werken krijgen regelmatig vragen van patiënten over het gebruik van hoge doseringen antioxidant gedurende de periode van radiotherapie. Diëtisten noch artsen lijken een eenduidige, goed onderbouwde mening te hebben over het advies aan patiënten over dit onderwerp. Het doel van dit literatuuronderzoek was het formuleren van een advies aan diëtisten over het gebruik van hoge doseringen antioxidant tijdens radiotherapie.

Radiotherapie resulteert in een verhoogde vorming van vrije radicalen en depletie van antioxidant in het lichaamssweefsel. Een vrije radicaal is een molecuul met één of meer ongepaarde elektronen, wat het molecuul zeer reactief maakt met andere moleculen. Dit kan leiden tot oxidatieve schade aan cellen, waardoor deze in structuur en functie kunnen veranderen (zie figuur 1). Antioxidanten zijn verbindingen in het lichaam die reageren met vrije radicalen en ze op die manier onschadelijk maken.<sup>1</sup> Door de vorming van vrije radicalen en het tekortschieten van het antioxidantstelsel tijdens radiotherapie kan het DNA in de cel beschadigd worden (zie figuur 2). Theoretisch gezien kunnen antioxidant een positief effect hebben op de bijwerkingen van

zijn gebruikt voor het literatuuronderzoek. Zowel studies met dieren als met mensen zijn geïncludeerd.

### Resultaten

Op basis van de zoekcriteria zijn achttien geschikte artikelen gevonden over de invloed van hoge doseringen antioxidant op de bijwerkingen van radiotherapie en één artikel over de invloed op de effectiviteit van radiotherapie. Over de antioxidant glutathion en co-enzym Q10 zijn helemaal geen geschikte publicaties gevonden.

De onderzoeksresultaten zijn ingedeeld naar de invloed van hoge doseringen antioxidant op de effectiviteit en op de bijwerkingen van radiotherapie. In de studies over de effectiviteit van radiotherapie werd de invloed van antioxidant op DNA-schade in tumorcellen onderzocht. In de studies over de bijwerkingen van radiotherapie werd de invloed van antioxidant op DNA-schade in gezonde cellen onderzocht.

#### 1. Invloed op de effectiviteit van radiotherapie

In het enige gevonden onderzoek over de invloed van antioxidant op tumorcellen nam de tumor van muizen in grootte af door depletie van  $\beta$ -caroteen na bestraling. Het aantal

## Samenvatting

**Doelstelling:** Er bestaat geen eenduidige, goed onderbouwde mening over het gebruik van hoge doseringen antioxidant gedurende de periode van radiotherapie. Het doel van dit literatuuronderzoek was het formuleren van een advies aan diëtisten over dit onderwerp.

**Methode:** Middels Pubmed (Medline) zijn 19 wetenschappelijke artikelen geselecteerd.

**Resultaten:** In een aantal dierstudies en vijf humane studies is aangetoond dat hoge doseringen antioxidant DNA-schade in gezonde cellen zouden kunnen verkleinen.  $\beta$ -Caroteen is het meest onderzocht en lijkt veelbelovend. Het effect van antioxidant op tumorcellen is in slechts één studie onderzocht.

**Beschouwing:** Tot op heden zijn onvoldoende onderzoeksgegevens bekend om het gebruik van hoge doseringen antioxidant aan of af te raden aan patiënten die radiotherapie ondergaan. De beschreven onderzoeken betreffen voornamelijk dierstudies en

maken gebruik van kleine onderzoeksgroepen en korte testperioden. Grootschalig klinisch onderzoek is noodzakelijk.

**Aanbeveling:** Patiënten die hoge doseringen antioxidant tijdens radiotherapie willen gebruiken moeten er door de diëtist op gewezen worden dat het effect op radiotherapie nog onvoldoende bekend is. Om depletie van antioxidant te voorkomen, kan een multivitaminenpreparaat worden geadviseerd. Indien de patiënt toch besluit om hoge doseringen antioxidant te gebruiken, moet de behandelend radiotherapeut hiervan op de hoogte gesteld wor-

muizen met een tumor dat een jaar overleefde, was significant hoger in de bestraalde  $\beta$ -caroteengroep dan in de overige groepen.<sup>3</sup>

## 2. Invloed op de bijwerkingen van radiotherapie

In een aantal dierstudies en slechts vijf humane studies is aangetoond dat hoge doseringen

$\beta$ -caroteen, vitamine E, vitamine C, melatonine of combinaties van antioxidanten DNA-schade in gezonde cellen verkleinen. Hierdoor zouden de bijwerkingen van radiotherapie verminderd kunnen worden. De opzet en resultaten van deze studies zijn per antioxidant weergegeven in tabel I.

### Vitamine E

Toediening van vitamine E vóór en na bestraling bood in gezonde cellen van muizen een goede bescherming tegen DNA-schade door radiotherapie.<sup>4,5</sup> Bij een onderzoek met ratten veroorzaakte vitamine E daarentegen een toename van DNA-schade in gezonde cellen. Bij dit onderzoek werd gebruik gemaakt van hogere doseringen bestraling en vitamine E dan bij de andere onderzoeken.<sup>6</sup>

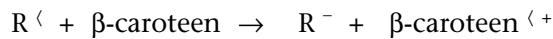
Het aantal muizen dat 30 dagen overleefde, werd vergroot door toediening van vitamine E (tabel II). Bij een zelfde onderzoeksopzet met een ander soort muizen werden geen significante verschillen in overleving aangetoond.<sup>7</sup>

### Vitamine C

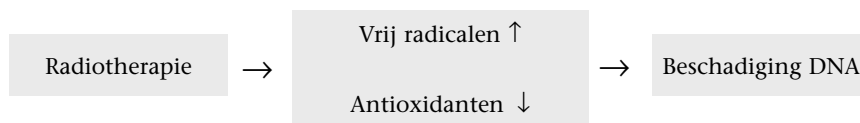
Vitamine C beschermde gezonde muizen en ratten in drie studies tegen DNA-schade door bestraling.<sup>4,5,6</sup> In andere studies bood vitamine C geen bescherming tegen DNA-schade<sup>4,5,8</sup> of werd de schade zelfs verergerd.<sup>5</sup> Bij mensen bracht suppletie van vitamine C geen vermindering van DNA-schade teweeg.<sup>8</sup> De oorzaak van het verschil in resultaten is onbekend.

### $\beta$ -caroteen

Toediening van  $\beta$ -caroteen vóór en na bestraling leidde in zeven studies tot minder DNA-schade in gezonde cellen van muizen en mensen.<sup>5,8,9,10,11,12,13</sup> In één dierstudie werd echter geen vermindering van DNA-schade waargenomen, omdat in deze studie een te hoge dosis  $\beta$ -caroteen werd gebruikt, waardoor de concentratie vitamine E in het plasma verminderde.<sup>10</sup> In een studie met muizen beschermde  $\beta$ -caroteen niet tegen DNA-schade in de beenmergcellen<sup>11</sup>, maar in een later onderzoek



Figuur 1. Mechanisme van de opruiming van vrije radicalen door antioxidanten ( $\beta$ -caroteen).  $\beta$ -Caroteen maakt de vrije radicaal met ongepaarde elektron ( $R^{\cdot}$ ) onschadelijk ( $R^{-}$ ). Hierbij ontstaat het relatief onreactieve  $\beta$ -caroteen radicaal ( $\beta\text{-caroteen}^{\cdot+}$ ).



Figuur 2. Radiotherapie resulteert in een verhoogde vorming van vrije radicalen en depletie van antioxidanten, wat kan leiden tot beschadiging van het DNA in de cel.

werd wel een bescherming aangetoond.<sup>12</sup> Een studie met mensen toonde aan dat de concentratie  $\beta$ -caroteen in het plasma toeneemt na suppletie van een hoge dosis  $\beta$ -caroteen. De verhoogde concentratie  $\beta$ -caroteen in het plasma van bestraalde bloedmonsters leidde tot een significante vermindering van DNA-schade in gezonde cellen.<sup>8</sup> Twee studies toonden aan dat suppletie van  $\beta$ -caroteen het aantal overlevende muizen vergrootte na radiotherapie (tabel III).<sup>12,14</sup>

### Melatonine

In twee studies beschermde toediening van melatonine tegen DNA-schade in bestraalde cellen van gezonde mensen. De proefpersonen met de hoogste concentratie melatonine in het bloed hadden de minste DNA-schade.<sup>15,16</sup>

### Verskillende antioxidanten

Gecombineerde toediening van verschillende antioxidanten bood in een aantal studies bescherming tegen DNA schade in gezonde cellen van muizen en mensen.<sup>4,5,17,18</sup> Maar in één studie verminderde een combinatie van antioxidanten de DNA-schade sterker dan de antioxidanten afzonderlijk.<sup>4,5</sup>

### Flavonoïden

In drie studies over flavonoïden werd DNA-schade door bestraling in gezonde cellen van muizen en mensen verminderd.<sup>19,20,21</sup> Omdat de studies echter moeilijk vergelijkbaar en erg onduidelijk beschreven zijn, kan minder waarde worden gehecht aan deze resultaten.

### Beschouwing

De beschreven onderzoeken geven onvoldoende wetenschappelijk bewijs om een richtlijn voor oncologische patiënten betreffende het gebruik van hoge doseringen antioxidanten tijdens radiotherapie op te stellen.

Een vermindering van DNA-schade in gezonde cellen zou de bijwerkingen van radiotherapie

**Tabel I.** Vermindering van DNA-schade in de cel door toediening van hoge doseringen antioxidanten vóór of na bestraling van dieren of mensen.

Onderzoek	Subjects	Gray	Toediening	Dosis (mg/kg)	Effect (1)
<b>Vitamine E</b>					
Sarma et al. <sup>4</sup>	Muizen (n=6/groep)	1	Eenmalig, 2 uur voor bestraling	3,1/ 6,2/ 12,5 25/ 50/ 100 200	0 + * + **
Sarma et al. <sup>4</sup>	Muizen (n=6/groep)	1	Eenmalig, 5 min en 2 uur na bestraling	25	+ **
Konopacka et al. <sup>5</sup>	Muizen (n=5-7/groep)	2	Per dag, gedurende 5 dagen voor bestraling	50 100 200	0 + * + *
Konopacka et al. <sup>5</sup>	Muizen (n=5-7/groep)	2	Eenmalig, direct na bestraling	200	+ *
El-Nahas et al. <sup>6</sup>	Ratten (n=4-7/groep)	5,2	Per dag, gedurende 6 maanden voor bestraling	100 300	0 - ***
<b>Vitamine C</b>					
Sarma et al. <sup>4</sup>	Muizen (n=6/groep)	1	Eenmalig, 2 uur voor bestraling	3,1/ 6,1/ 12,5 25/ 50/ 100 200/ 400/ 800	0 0 + **
Sarma et al. <sup>4</sup>	Muizen (n=6/groep)	1	Eenmalig, 5 min en 2 uur na bestraling	400 400	+ ** + *
Konopacka et al. <sup>5</sup>	Muizen (n=5-7/groep)	2	Per dag, gedurende 5 dagen voor bestraling	50 100 200 400	+ * + * 0 - *
Konopacka et al. <sup>5</sup>	Muizen (n=5-7/groep)	2	Eenmalig, direct na bestraling	400	+ *
El-Nahas et al. <sup>6</sup>	Ratten (n=4-7/groep)	5,2	Per dag, gedurende 6 maanden voor bestraling	100 300	+ * + *
Umegaki et al. <sup>8</sup>	Mensen (n=17)	0,6	Per dag, gedurende 6 dagen voor bestraling van een bloedmonster	(2) 300	0
<b>β-Caroteen</b>					
Konopacka et al. <sup>5</sup>	Muizen (n=5-7/groep)	2	Per dag, gedurende 5 dagen voor bestraling	3 6 12	+ * + * + *
Konopacka et al. <sup>5</sup>	Muizen (n=5-7/groep)	2	Eenmalig, direct na bestraling	12	+ *
Umegaki et al. <sup>8</sup>	Mensen (n=33)	0,6	Per dag, gedurende 6 dagen voor bestraling van een bloedmonster(2)	30	+ ***
Abraham et al. <sup>9</sup>	Muizen (n=6/groep)	1,15	Per dag, gedurende 7 dagen voor bestraling	0,5 2,5	+ ** + **
Umegaki et al. <sup>10</sup>	Muizen (n=30)	0,3	Per dag, gedurende 4 weken voor bestraling	50 400	+ * 0
	Muizen (n=19)	0,3	Per dag, gedurende 7 dagen voor bestraling	300	+ *

Vervolg Tabel I.

Onderzoek	Subjects	Gray	Toediening	Dosis (mg/kg)	Effect (1)
Salvadori et al. <sup>11</sup>	Muizen (n=?)	2	Per dag, gedurende 5 dagen voor bestraling	10 25 50	+/- +/- +/-
Umegaki et al. <sup>12</sup>	Muizen (n=?)	1,5	Per dag, gedurende 2 weken voor bestraling	(2) 2,63	+ *
Ben-Amotz et al. <sup>13</sup>	Kinderen (n=262)	?	10 jaar na Chernobyl accident. Per dag, gedurende 3 maanden	(2) 40	+ *
<b>Melatonine</b>					
Vijayalaxmi et al. <sup>15</sup>	Mensen (n=4)	1	Eenmalig, 1 uur voor bestraling van een bloedmonster	300	+ **
Vijayalaxmi et al. <sup>16</sup>	Mensen (n=4)	1,5	Eenmalig, 1 uur voor bestraling van een bloedmonster	300	+ ***
<b>Combinaties van antioxidanten</b>					
Sarma et al. <sup>4</sup>	Muizen (n=6/groep)	1	Eenmalig, 2 uur voor bestraling	400 Vit C 25 Vit E	+ **
Sarma et al. <sup>4</sup>	Muizen (n=6/groep)	1	Eenmalig, 5 min en 2 uur na bestraling	400 Vit C 25 Vit E	+ **
Konopacka et al. <sup>5</sup>	Muizen (n=5-7/groep)	2	Per dag, gedurende 5 dagen voor bestraling	50 Vit C 200 Vit E	+ *
Ushakova et al. <sup>17</sup>	Muizen (n=60)	6	Per dag, gedurende 45 dagen voor bestraling	12 β-caroteen 7,5 β-caroteen 15 Vit E 50 Vit C 25 Selenium 5 Zink 25 Rutine	+ *
Emerit et al. <sup>18</sup>	Mensen (n=67)	0,03-1	10 jaar na Chernobyl accident Per dag, gedurende 5 maanden	Supplement: vitaminen, mineralen, plantenfenolen	+ ***

(1)

- + Significant minder DNA-schade door toediening van hoge doseringen antioxidanten in vergelijking tot controlegroep.
- 0 DNA-schade onveranderd door toediening van hoge doseringen antioxidanten in vergelijking tot controlegroep.
- +/- In sommige typen cellen significant minder DNA-schade door toediening van hoge doseringen antioxidanten in vergelijking tot controlegroep.
- Significant meer DNA-schade door toediening van hoge doseringen antioxidanten in vergelijking tot controlegroep.
- \* p<0,05
- \*\* p<0,01
- \*\*\* p<0,001.

(2) Dosering van antioxidanten in mg per dag in plaats van mg per kg.

**Tabel II.** Dertigdagen-overleving van bestraalde muizen na toediening van vitamine E. Vlak vóór bestraling werd een eenmalige dosis vitamine E toegediend van driemaal de aanbevolen hoeveelheid voor muizen (n=10/groep).<sup>7</sup>

	% overlevenden na 7,5 Gy	% overlevenden na 8,5 Gy
Vitamine E-groep	100%	60%
Controlegroep	10%	0%

radiotherapie door DNA-schade in gezonde cellen te verkleinen. Tevens kan het de effectiviteit van radiotherapie verhogen door de DNA-schade in tumorcellen te vergroten. Een negatief effect is echter ook mogelijk, doordat antioxidanten tumorcellen kunnen beschermen tegen DNA-schade door straling. Hierdoor zou de effectiviteit van radiotherapie verminderd kunnen worden.<sup>2</sup>

**Methoden**

Door middel van literatuuronderzoek is geïnventariseerd wat tot op heden is onderzocht over de invloed van hoge doseringen antioxidanten op de effectiviteit en de bijwerkingen van radiotherapie.

De artikelen zijn in november 2002 verzameld via Pubmed (Medline) met de zoektermen ['radiation oncology' OR 'radiotherapy'] en ['antioxidants']. Met behulp van de literatuurlijsten van deze artikelen zijn de overige artikelen verzameld. Om het literatuuronderzoek relevant te houden voor de diëtetiek, zijn alleen artikelen gebruikt over antioxidanten die in voeding of in voedingssupplementen voorkomen en die per os toegediend zijn. De volgende antioxidanten vielen binnen deze criteria: glutathion, vitamine E, β-caroteen, vitamine C, flavonoïden, co-enzym Q10, melatonine en combinaties van deze antioxidanten. Alleen artikelen van placebo-gecontroleerde studies die de afgelopen vijf jaar gepubliceerd zijn in gerenommeerde (impact factor van ≥1,5), niet-alternatieve tijdschriften

**Tabel III.** Dertigdagenoverleving van bestraalde muizen na toediening van β-caroteen.

	% overlevenden na 5,1 Gy <sup>1</sup>	% overlevenden na 6,5 Gy <sup>2</sup>
β-Caroteen-groep	100%	60%
Controlegroep	50%	0%

1. De muizen (n=160) kregen direct na bestraling 270 µg β-caroteen/dag gedurende 7 dagen.<sup>14</sup>
2. De muizen (n=16) kregen vóór bestraling 2,63 mg β-caroteen/dag gedurende 7 weken.<sup>12</sup>

kunnen verkleinen. In dierstudies is beschreven dat hoge doseringen β-caroteen, vitamine E, vitamine C of combinaties van antioxidanten de DNA-schade in gezonde cellen verminderden. In vijf humane studies werd de DNA-schade in gezonde cellen van mensen verminderd door hoge doseringen melatonine, β-caroteen of combinaties van antioxidanten. Van deze antioxidanten is β-caroteen het meest onderzocht en de resultaten van deze studies lijken veelbelovend. De invloed van antioxidanten op de tumorcellen is maar in één dierstudie onderzocht, waarbij de grootte van tumorcellen afnam door suppletie van β-caroteen.

Een belangrijk aandachtspunt bij de interpretatie van de beschreven onderzoeken is dat het voornamelijk dierstudies zijn. Bovendien maken vrijwel alle studies gebruik van kleine onderzoeksgroepen en korte testperioden. Om deze redenen kunnen de bevindingen uit deze studies niet zomaar worden omgezet in adviezen voor de mens.

Niet alle studies naar de invloed van hoge doseringen antioxidanten op de bijwerkingen van radiotherapie hadden een gunstig resultaat. In een onderzoek met β-caroteen en twee onderzoeken met vitamine C verminderde de DNA-schade na bestraling niet door suppletie. In een onderzoek met vitamine E en een met vitamine C nam de DNA-schade door suppletie zelfs toe. Mogelijke oorzaken van deze afwijkende resultaten waren het gebruik van een te hoge dosis antioxidanten, te hoge bestraling of de soort proefdieren.

In een aantal studies werden supplementen gebruikt, bestaande uit meerdere micronutriënten, waardoor het minder duidelijk is door welke stoffen het beschermende effect veroorzaakt wordt.

Om een advies te kunnen geven over het gebruik van antioxidanten tijdens radiotherapie is groot-schalig klinisch onderzoek naar de invloed van verschillende antioxidanten op de effectiviteit en op de bijwerkingen van radiotherapie noodzakelijk. De volgende aspecten moeten daarbij worden onderzocht: tijdstip van toediening, dosis en toedieningsduur van antioxidanten, bestralingsdosis en de achterliggende mechanismen van de invloed van antioxidanten bij radiotherapie.

**Aanbeveling**

Tot op heden zijn onvoldoende onderzoeksgegevens bekend om een goede richtlijn met betrekking tot suppletie van hoge doseringen antioxidanten bij radiotherapie op te stellen. Om

deze reden is het nog niet mogelijk het gebruik van hoge doseringen antioxidanten aan of af te raden aan patiënten die radiotherapie ondergaan. Patiënten die hoge doseringen antioxidanten tijdens radiotherapie willen gebruiken, zouden door de diëtist of arts moeten worden voorgelicht dat het effect op de bijwerkingen en vooral op de effectiviteit van radiotherapie nog onvoldoende bekend is. Om depletie van antioxidant in het lichaamswefsel als gevolg van radiotherapie te voorkomen, kan een multivitaminepreparaat dat voldoet aan de aanbevolen hoeveelheid worden aangeraden aan patiënten die radiotherapie ondergaan. Indien de patiënt toch besluit om hoge doseringen antioxidant te gebruiken, dient de behandelend radiotherapeut hiervan op de hoogte gesteld te worden.

#### Literatuur

1. Clemens MR, et al. Plasma vitamin E and beta-carotene concentrations during radiochemotherapy preceding bone marrow transplantation. *Am J Clin Nutr* 1990;51:216-219.
2. Prasad KN, et al. Pros and cons of antioxidant use during radiation therapy. *Cancer Treat Rev* 2002;28:79-91.
3. Seifter E, et al. Vitamin A and beta-carotene as adjunctive therapy to tumor excision, radiation therapy and chemotherapy. In: Prasad KN. *Vitamins, nutrition and cancer*. Karger: Basel, 1984. p. 1-19.
4. Sarma L, Kesavan PC. Protective effects of vitamins C and E against  $\gamma$ -ray-induced chromosomal damage in mouse. *Int J Radiat Biol* 1993;63(6):759-764.
5. Konopacka M, Widel M, Rzeszowska-Wolny J. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutat Res* 1998;417:85-94.
6. El-Nahas SM, Mattar FE, Mohamed AA. Radioprotective effect of vitamins C and E. *Mutat Res* 1993;301:143-147.
7. Srinivasan V, et al. Radioprotection by vitamin E: effects on hepatic enzymes, delayed type hypersensitivity, and post-irradiation survival of mice. In: *Modulation and mediation of cancer by vitamins*. Karger: Basel, 1983. p.119-131.
8. Umegaki K, et al. Beta-carotene prevents X-ray induction of micronuclei in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1994;59:409-412.
9. Abraham SK, Sarma L, Kesavan PC. Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and  $\beta$ -carotene against  $\gamma$ -radiation-induced in vivo chromosomal damage. *Mutat Res* 1993;303:109-112.
10. Umegaki K, et al. Effect of  $\beta$ -carotene on spontaneous and X-ray-induced chromosomal damage in bone marrow cells of mice. *Nutr Cancer* 1994;22(3):277-284.
11. Salvadori DMF, et al. Radioprotection of  $\beta$ -carotene evaluated on mouse somatic and germ cells. *Mutat Res* 1996;356:163-170.
12. Umegaki K, et al. Feeding mice palm carotene prevents DNA damage in bone marrow and reduction of peripheral leukocyte counts, and enhances survival following X-ray irradiation. *Carcinogenesis* 1997;18(10):1943-1947.
13. Ben-Amotz A, et al. Effect of natural  $\beta$ -carotene supplementation in children exposed to radiation from the Chernobyl accident. *Radiat Environ Biophys* 1998;37:187-193.
14. Seifter E, et al. Morbidity and mortality reduction by supplemental vitamin A or  $\beta$ -carotene in CBA mice given total body  $\gamma$ -radiation. *JNCI* 1984;73(5):1167-1177.
15. Vijayalaxmi, et al. Melatonin reduces gamma radiation-induced primary DNA damage in human blood lymphocytes. *Mutat Res* 1998;397(2):203-208.
16. Vijayalaxmi, et al. Melatonin and radioprotection from genetic damage: in vivo/in vitro studies with human volunteers. *Mutat Res* 1996;371:221-228.
17. Ushakova T, et al. Modification of gene expression by dietary antioxidants in radiation-induced apoptosis of mice splenocytes. *Free Rad Biol Med* 1999;26(7/8):887-891.
18. Emerit I, et al. Oxidative stress-related clastogenic factors in plasma from Chernobyl liquidators: protective effects of antioxidant plant phenols, vitamins and oligoelements. *Mutat Res* 1997;377:239-246.
19. Emerit I, et al. Clastogenic factors in the plasma of Chernobyl accident recovery workers: anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract. *Mutat Res* 1997;337:239-246.
20. Shimoi K, et al. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in  $\gamma$ -ray irradiated mice. *Carcinogenesis* 1994;15(11):2669-2672.
21. Shimoi K, et al. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutat Res* 1996;350:153-161.