

# Lage melatoninespiegel bij moeder vergroot risico op autisme bij haar kind

Wiebe Braam<sup>1,2</sup>, Friederike Ehrhart<sup>2,3</sup>, Anneke P.H.M. Maas<sup>2,4</sup>, Marcel G. Smits<sup>2,5</sup>, Leopold Curfs<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 's Heeren Loo, Advisium, Wekerom

<sup>2</sup> Gouverneur Kremers Centrum, Maastricht Universitair Medisch Centrum, Maastricht

<sup>3</sup> Afdeling Bioinformatica – BiGCaT, Universiteit Maastricht, Maastricht

<sup>4</sup> Faculteit der Sociale Wetenschappen, Radboud Universiteit, Nijmegen

<sup>5</sup> Multidisciplinair expertisecentrum voor slaap-waakstoornissen en chronobiologie, Gelderse Vallei Ziekenhuis, Ede

## Samenvatting:

**Achtergrond:** Autismespectrumstoornis (ASS) wordt veroorzaakt door een combinatie van genetische en omgevingsfactoren. Bij 70% van de mensen met ASS is tevens sprake van een verstandelijke beperking (VB). Er zijn inmiddels ruim 800 genetische variaties gevonden als potentiële veroorzakers, maar niet een daarvan is verantwoordelijk voor meer dan 1% van de gevallen van ASS.

Lage melatonine spiegels worden vaak bij ASS gevonden en vertonen een omgekeerde correlatie met de ernst van de stoornis. Melatonine speelt een belangrijke rol bij de ontwikkeling van de hersenen en beschermt DNA effectief tegen oxidatieve schade. Omdat de foetus geen melatonine kan maken, zouden lage maternale melatonine spiegels een rol kunnen spelen bij het ontstaan van ASS.

**Methode:** Bepalen van 6-sulfatoxymelatonine (6-SM) uitscheiding in urine bij 60 moeders met een kind met ASS en controles. Omdat melatoninespiegels na de puberteit met 2,7% per jaar dalen werden de uitslagen ook herberekend naar de leeftijd waarop deelnemers hun kind kregen.

**Resultaten:** De actuele 6-SM spiegels waren bij ASS moeders significant lager dan bij controles ( $p = 0,012$ ), evenals de herberekende 6-SM spiegels ( $p = 0,002$ ). Bij moeders met twee ASS kinderen waren de 6-SM spiegels lager dan bij moeders met één ASS kind, maar dit verschil was niet significant ( $p = 0,058$ ).

**Conclusie:** Een lage melatonine spiegel zou een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan het ontstaan van ASS en mogelijk ook van een VB. Onze bevindingen dienen op een grotere schaal herhaald te worden. Indien onze hypothese klopt biedt dit mogelijkheden tot het opsporen van moeders met een verhoogd risico op ASS en strategieën voor preventie.

## Inleiding

Autisme Spectrum Stoornis (ASS) is de naam voor een verzameling van aandoeningen die gekenmerkt worden

door afwijkingen in onder meer sociaal gedrag en spraak. Bij 70% van de mensen met een ASS is tevens sprake van een verstandelijke beperking (VB), terwijl bij 40% van de mensen met een VB tevens kenmerken van ASS aanwezig zijn.<sup>1</sup> Het frequent samengaan van ASS en VB roept de vraag op of er niet sprake kan zijn van een gemeenschappelijke factor in de etiologie, met name omdat in ernstiger gevallen van ASS vaker sprake is van een VB, net als dat er in ernstiger gevallen van VB vaker tevens sprake is van ASS.<sup>2,3</sup>

## Oorzaken ASS

Algemeen wordt aangenomen dat er genetische factoren meespelen bij het ontstaan van ASS. Zo is bij ouders met een kind met ASS het risico op het opnieuw krijgen van een kind met ASS 25 maal groter dan in de algemene bevolking.

Tot nu toe zijn er al meer dan 800 genetische variaties gevonden, waarvan er echter niet één verantwoordelijk is voor meer dan 1% van de gevallen van ASS.<sup>4</sup> Toch wordt slechts bij ongeveer 25% van de kinderen met ASS een specifieke genetische afwijking vastgesteld.<sup>5</sup>

Bij onderzoek naar de oorzaak van ASS is genetisch onderzoek bij tweelingen, waarbij bij een of beiden de diagnose ASS is gesteld, erg belangrijk. Uit gegevens van een onderzoek bij 192 tweelingen blijkt dat bij identieke (monozygote) tweelingen maar in 77% van de gevallen ook bij de andere van de tweeling de diagnose ASS gesteld kon worden. Bij niet-identieke (dizygote) tweelingen kon toch ook in 31% ook bij de andere van de tweeling de diagnose ASS gesteld worden. Op basis van deze gegevens kon worden berekend dat het aandeel van genetische factoren bij het ontstaan van ASS kleiner was (38%) dan van een voor de tweeling gemeenschappelijke omgevingsfactor (58%).<sup>6</sup> Daarom wordt momenteel aangenomen dat ASS wordt veroorzaakt door een combinatie van een de novo ontstane genetische variatie en common variants met omgevingsfactoren.

In epidemiologische studies zijn meerdere omgevingsfactoren gevonden die samengaan met een verhoogd risico op ASS.<sup>7-12</sup> Vele hiervan hebben te maken met de zwangerschap, zoals foetale nood, meerlingzwangerschap, laag geboortegewicht, prematuriteit, zwangerschapsdiabetes, lage Apgarscore, geen borstvoeding krijgen<sup>13</sup>, blootstelling aan pesticiden en hogere leeftijd van de ouders.

### Melatonine

Melatonine is een hormoon dat, naast slaapinductie en regulatie van het circadiane ritme, onder meer als antioxidant DNA beschermt tegen schadelijke effecten van straling en giftige stoffen.<sup>14,15</sup>

Synthese van melatonine vindt 's nachts in twee stappen plaats in de pijnappelklier vanuit serotonine. Hierbij zijn de enzymen AANAT en ASMT betrokken. Bij blootstelling aan licht neemt de activiteit van ASMT snel af en daalt de melatonine spiegel. Tijdstip en vorm van de melatonine curve zijn individueel bepaald en constant.<sup>16</sup> Wel is er met het ouder worden een langzame afname van de hoeveelheid 's nachts geproduceerde melatonine van ongeveer 2,7% per jaar.<sup>17</sup>

Er bestaan geen internationaal aanvaarde normaalwaarden voor melatonine. Ook is niet duidelijk wanneer sprake is van melatonine deficiëntie. Dit is opmerkelijk gezien de belangrijke eigenschappen van melatonine in het lichaam en het aantal ziekten waarbij lage melatonine spiegels worden gevonden (hart- en vaatziekten, maligniteiten, ziekte van Alzheimer en Parkinson).<sup>18</sup>

Melatonine wordt voornamelijk in de lever afgebroken door CYP1A2 en in de urine uitgescheiden als 6-sulfatoxymelatonin (6-SM). De hoeveelheid 6-SM in de eerste ochtend urine correleert in hoge mate met de hoeveelheid 's nachts geproduceerde melatonine.<sup>19</sup>

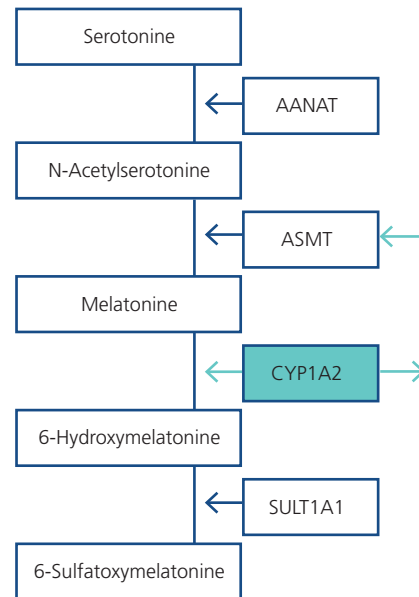
De halfwaardetijd van melatonine is kort (28-126 minuten).<sup>20</sup> Polymorfismen in het CYP1A2 gen kunnen aanleiding geven tot sterke afname van de CYP1A2 enzymactiviteit (10 tot 200-voudig), waardoor de halfwaardetijd van melatonine sterk kan toenemen (CYP1A2 slow metaboliser).<sup>21</sup> Dit kan bij toedienen van exogeen melatonine leiden tot 24uur hoge melatonine spiegels (melatonine stapeling).

### De relatie tussen melatonine en ASS

Bij mensen met ASS worden meestal lage endogene melatonine spiegels gevonden.<sup>22-25</sup> Er bestaat een negatieve correlatie tussen de hoogte van de melatonine spiegel en de ernst van de beperkingen bij ASS.<sup>25</sup> De lage melatonine spiegels bij ASS worden niet veroorzaakt door afwijkingen in het AANAT en ASMT gen. Deze worden namelijk bij minder dan 1% van mensen met ASS gevonden en bovendien ook

aangetroffen bij gezonde controles.<sup>26,27</sup> CYP1A2 polymorfismen worden wel vaker aangetroffen bij mensen met ASS.<sup>28</sup> Dit is interessant, aangezien er aanwijzingen zijn dat het CYP1A2 gen de activiteit van het ASMT gen activeert.<sup>29</sup> Een lage CYP1A2 activiteit zou daarmee tot een lagere ASMT activiteit en dus tot lagere aanmaak van melatonine kunnen leiden. Dit kan verklaren waarom er bij mensen met een lage CYP1A2 activiteit, ondanks de trage melatonine afbraak, toch lage endogene melatonine spiegels aanwezig zijn.

Figuur 1 - Schema aanmaak en afbraak melatonine



Synthese melatonine in 2 stappen vanuit serotonine (door enzymen AANAT en ASMT). Afbraak melatonine in 2 stappen tot 6-SM (door CYP1A2 en SULT1A1). CYP1A2 activeert zowel afbraak melatonine als enzym ASMT (2e fase synthese melatonine).

De melatonine productie begint pas tussen de 9<sup>e</sup> en 15<sup>e</sup> week na de geboorte op gang te komen.<sup>30</sup> Tijdens de foetale ontwikkeling en tijdens de eerste weken na de geboorte is een kind dus volledig afhankelijk van de melatonine van moeder. Melatonine passeert echter gemakkelijk de placenta barrière. Ook is melatonine aanwezig in moedermelk. Dit verklaart dat het risico op ASS bij kinderen die geen borstvoeding kregen groter is.<sup>13</sup>

Melatonine is, zowel tijdens de foetale periode als na de geboorte, noodzakelijk voor een normale ontwikkeling van de hersenen, onder meer door betrokkenheid bij de groei van neuronen en vorming van synapsen.<sup>24, 31, 32</sup> Zoals hierboven kort is samengevat, zijn er meerdere

redenen om te komen tot de hypothese dat een lage melatonine spiegel bij mensen met ASS niet het gevolg, maar juist onderdeel is van de pathogenese van ASS.<sup>28</sup>

### Pilot studie melatonine spiegels bij moeders met een ASS kind

Gezien het zeer frequent aanwezig zijn van lage melatonine spiegels bij mensen met ASS, de betrokkenheid van melatonine bij neurale ontwikkeling, het aanwezig zijn van ASS bij de geboorte en de volledige afhankelijkheid van melatonine van de moeder tijdens de zwangerschap en eerste drie levensmaanden, mag worden verwacht dat lage melatonine spiegels bij de moeder betrokken zijn bij het ontstaan van ASS. Daarom werd gekozen voor het onderzoeken van de uitscheiding van 6-SM in de eerste ochtendurine van moeders van een kind met ASS dat onze slaappoli bezocht in de periode 2014 - 2016. Vrouwen die werkzaam waren in het gebouw waar de slaappoli is gevestigd fungeerden als controle. Exlusie criteria waren het hebben van een kind met ASS en ASS in de familie in de eerste en tweede lijn.

### Deelnemers en procedure

Van de 97 kinderen die in de onderzoeksperiode de slaappoli bezochten was bij 18 geen sprake van ASS en werden 13 moeders om andere redenen van deelname uitgesloten (adoptiekind, gebruik melatonine, taalproblemen). Na het ontvangen van informatie en geven van toestemming voor het onderzoek, kregen moeders verzendmateriaal voor 10ml urine mee alsmede een lijst met zes algemene vragen (leeftijd, gewicht, medicijngebruik, samenstelling gezin) en zeven vragen over slaap ter bepaling van de Insomnia Severity Index.<sup>33</sup>

Urine werd na ontvangst ingevroren tot de daadwerkelijke meting van 6-SM en kreatinine ter bepaling van de 6-SM/kreatinine ratio. Aangezien melatonine spiegels elk jaar met 2,7% dalen werd de uitslag herberekend naar de leeftijd waarop elke moeder haar kind met ASS kreeg. Bij controle moeders vond herberekening plaats naar het gemiddelde van de geboorte van het oudste en het jongste kind.

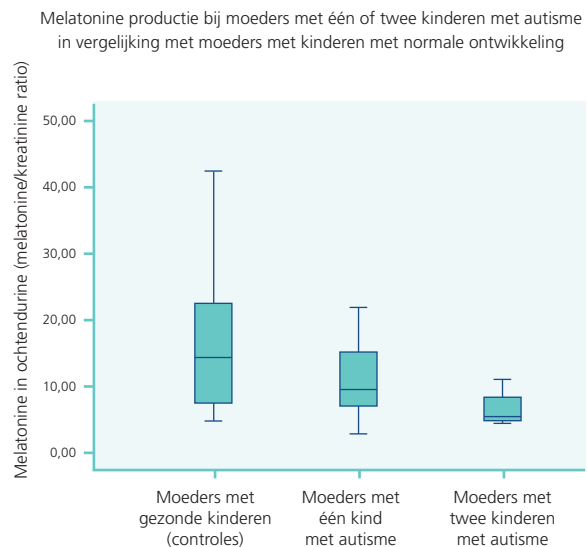
### Resultaten

Van de 66 moeders die toestemden in deelname aan het onderzoek trok 1 zich terug zonder aangeven van de reden hiervan. Van vijf anderen ontvingen we geen urinemonster. De gemiddelde leeftijd van de 60 deelnemers was 42,9 ( $\pm$  5) jaar en van de 15 moeders die als controle fungeerden was 44,3 ( $\pm$  9,7) jaar. Er waren geen significante verschillen met betrekking tot leeftijd ( $p = 0,486$ ), gewicht ( $p = 0,270$ ) en tijdstip van naar bed gaan ( $p = 0,985$ ) tussen de moeders van een ASS kind en controles. De gemiddelde leeftijd waarop moeders hun kind met ASS kregen was wel hoger (31,2 jaar) dan bij controle moeders (28,1 jaar) en dit verschil was significant ( $p = 0,01$ ).

Wij vonden in onze studie bij moeders met een ASS kind een significant lagere uitscheiding van 6-SM ( $7,67 \pm 3,62$ ) in vergelijking met controlemoeders ( $10,42 \pm 6,72$ ,  $p = 0,012$ ). Omdat moeders met een kind met ASS op latere leeftijd hun kind kregen en melatonine spiegels na het 20<sup>e</sup> jaar met 2,7 per jaar dalen, vond herberekening plaats van de 6-SM uitslagen naar de leeftijd van de moeders waarop het kind werd geboren. De verschillen in 6-SM uitscheiding tussen de moeders met een ASS kind en controles was hierbij nog groter ( $10,52 \pm 5,20$  resp.  $16,67 \pm 10,72$ ,  $p = 0,002$ ).

Van de 60 deelnemende moeders met een ASS kind hadden er vijf nog een tweede kind met ASS. Bij een van hen was de diagnose Prader Willi syndroom vastgesteld, een genetische stoornis van paternale oorsprong. De gemiddelde 6-SM/kreatinine ratio bij de overige vier moeders was lager ( $6,54 \pm 3,04$ ) dan bij de 54 moeders met één kind met ASS (gemiddeld  $10,80 \pm 5,22$ ,  $p = 0,058$ ), maar dit verschil was net niet significant.

Figuur 2 - 6-SM/kreatinine ratio in urine



Boxplot, een grafische weergave van de verdeling van de 6-SM/kreatinine ratio waarden bij moeders met gezonde kinderen, met één kind met autisme en twee kinderen met autisme. Hierbij worden 5 waarden grafisch weergegeven, namelijk (van boven naar beneden) de hoogste 6-SM/kreatinine ratio waarde (bovenste horizontale streep), 3<sup>e</sup> kwartiel (bovenkant box), mediaan (horizontale streep middenin de box), 1<sup>e</sup> kwartiel (oderkant box) en de laagste 6-SM/kreatinine ratio waarde (bovenste horizontale streep). Confidence interval for mean 95%.

## Discussie

In deze studie vonden wij een significant lagere 6–SM uitscheiding bij moeders met een kind met ASS dan bij moeders met gezonde kinderen. Dit verschil kan niet worden toegeschreven aan het verschil in leeftijd ten tijde van de geboorte van hun kind en ook niet aan een verschil in slaapduur.

De huidige opvatting over de oorzaak van ASS is dat er sprake is van een combinatie van genetische factoren en van omgevingsfactoren. Melatonine deficiëntie kan bij beide een rol spelen. De hoogte van de melatonine spiegel is genetisch bepaald, melatonine bezit neurotrope eigenschappen en melatonine beschermt tegen schadelijke omgevingsfactoren die geassocieerd zijn met een hoger risico op ASS en op ontstaan van DNA afwijkingen. Dit, in combinatie met de totale afhankelijkheid van de foetus van melatonine van de moeder, ondersteunt onze hypothese dat lage melatonine spiegels bij moeders betrokken kunnen zijn bij het ontstaan van ASS bij het kind.

Indien ook bij het kind sprake is van te lage melatonine spiegels kan dit bijdragen aan reeds bestaande schade tijdens de verdere hersenontwikkeling. Bekend is dat bij mensen met ASS de hoogte van de melatonine spiegel omgekeerd evenredig is aan de ernst van de beperkingen<sup>25</sup>. Het duale effect van melatonine kan ook een verklaring bieden voor de bevindingen bij een onderzoek bij tweelingen die beiden ASS hebben maar in 68% van de gevallen niet dezelfde voor ASS verklarende genetische afwijking bleken te hebben. Het kan ook verklaren waarom bij 40% van de mensen met een verstandelijke beperking tegelijk ook sprake is van ASS en tegelijk ook dat bij 70% van de mensen met ASS sprake is van een verstandelijke beperking. Onze bevinding dat de 6–SM uitscheiding bij moeders met twee kinderen met ASS lager was dan bij moeders met een kind met ASS past hierbij.

Een beperking van onze studie is dat het aantal deelnemers te klein is om stevige conclusies te trekken. Ons onderzoek zal dan ook op een grotere schaal herhaald moeten worden. Daarbij dient dan bovendien op DNA niveau gekeken worden naar bij de melatonine pathway betrokken genen. Voor zover wij konden nagaan is dit de eerste studie waarin duidelijke aanwijzingen worden gevonden voor betrokkenheid van lage melatonine spiegels bij moeders bij het ontstaan van ASS bij haar kind. In combinatie met andere, reeds bekende, risicofactoren voor ASS leidt dit tot een hypothese die uitzicht biedt op toekomstig preventief onderzoek en behandeling.

Wiebe Braam

Correspondentie: braam@planet.nl

Onze dank gaat uit naar de moeders van onze cliënten en aan medewerkers van 's Heeren Loo locatie Wekerom voor deelname aan dit onderzoek, aan Lars Eijssen en Egon L. Willighagen voor deelname aan discussies, en aan Martijn Faassen voor het bepalen van de 6–SM-kreatinine ratio.

Deze studie werd mede mogelijk gemaakt door financiële ondersteuning van de 's Heeren Loo Zorggroep.

Dit is een samenvatting van "Low maternal melatonin level increases autism spectrum disorder risk in children" dat verscheen in *Research in Developmental Disorders* 2018 Feb 28. pii: S0891-4222(18)30042-8. doi: 10.1016/j.ridd.2018.02.017.

## Referenties

- 1 Matson JL & Shoemaker M. Intellectual disability and its relationship to autism spectrum disorders. *Res Dev Disabil* 2009; 30:1107-1114.
- 2 Gotham K, Pickles A & Lord C. Trajectories of autism severity in children using standardized ADOS scores. *Pediatrics* 2012; 130: e1278-1284.
- 3 Vig S & Jedrysek E. Autistic features in young children with significant cognitive impairment: autism or mental retardation? *J Autism Dev Disord* 1999; 29:235-248.
- 4 Li X, Zou H & Brown WT. Genes associated with autism spectrum disorder. *Brain Res Bull* 2012;88:543-552.
- 5 Woodbury-Smith M & Scherer SW. Progress in the genetics of autism spectrum disorder. *Dev Med Child Neurol*. 2018; 60:445-451.
- 6 Hallmayer J, Cleveland S, Torres A et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry* 2011; 68:1095-1102.
- 7 Gardener H, Spiegelman D, & Buka, SL. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry* 2009; 195:7-14.
- 8 Gardener H, Spiegelman D, & Buka SL. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics* 2011; 128:344-355.
- 9 Kuzniewicz MW, Wi S, Qian Y et al. Prevalence and neonatal factors associated with autism spectrum disorders in preterm infants. *J Pediatr* 2014; 164:20-25.
- 10 Mandy W & Lai MC. Annual Research Review: The role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition. *J Child Psychol Psychiatry* 2016; 57:271-292.
- 11 Modabbernia A, Velthorst E & Reichenberg A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol Autism* 2017; 8:13.
- 12 Walker CK, Krakowiak P, Baker A et al. Preeclampsia, placental insufficiency, and autism spectrum disorder or developmental delay. *JAMA Pediatr* 2015; 169:154-162.
- 13 Al-Farsi YM, Al-Sharbaty MM, Waly MI et al. Effect of suboptimal breast-feeding on occurrence of autism: a case-control study. *Nutrition* 2012; 28:7-8, e27-32.
- 14 Bejarano I, Monllor F, Marchena AM et al. Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stress-evoked DNA damage in human spermatozoa. *J Pineal Res* 2014; 57:333-339.
- 15 Reiter RJ, Tan DX & Galano A. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. *Front Physiol* 2014; 5:377.
- 16 Arendt J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms* 2005; 20: 291-303.
- 17 Kennaway DJ, Lushington K, Dawson D et al. Urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion and aging: new results and a critical review of the literature. *J Pineal Res* 1999; 27:210-220.

- <sup>18</sup> Posadzki PP, Bajpai R, Kyaw BM et al. Melatonin and health: an umbrella review of health outcomes and biological mechanisms of action. *BMC Med* 2018; 6:18.
- <sup>19</sup> Arendt J, Hampton S, English J et al. 24-hour profiles of melatonin, cortisol, insulin, C-peptide and GIP following a meal and subsequent fasting. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1982; 16:89-95.
- <sup>20</sup> Fourtillan JB, Brisson AM, Gobin P et al. Bioavailability of melatonin in humans after day-time administration of D(7) melatonin. *Biopharm Drug Dispos* 2000; 21:15-22.
- <sup>21</sup> Gunes A & Dahl ML. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2008; 9:625-637.
- <sup>22</sup> Kulman G, Lissoni P, Rovelli F et al. Evidence of pineal endocrine hypofunction in autistic children. *Neuro Endocrinol Lett* 2000; 21:31-34.
- <sup>23</sup> Nir I, Mei D, Zilber N and al. Brief report: circadian melatonin, thyroid-stimulating hormone, prolactin, and cortisol levels in serum of young adults with autism. *J Autism Dev Disord* 1995; 25:641-654.
- <sup>24</sup> Rossignol DA, & Frye RE. Melatonin in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol* 2011; 53:783-792.
- <sup>25</sup> Tordjman S, Anderson GM, Pichard N et al. Nocturnal excretion of 6-sulphatoxymelatonin in children and adolescents with autistic disorder. *Biol Psychiatry* 2005; 57:134-138.
- <sup>26</sup> Melke J, Goubran Botros H, Chaste P et al. Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry* 2008; 13:90-98.
- <sup>27</sup> Pagan C, Delorme R, Callebert J et al. The serotonin-N-acetylserotonin-melatonin pathway as a biomarker for autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry* 2014; 4: e479.
- <sup>28</sup> Braam W, Keijzer H, Struijker Boudier H et al. CYP1A2 polymorphisms in slow melatonin metabolisers: a possible relationship with autism spectrum disorder? *J Intellect Disabil Res* 2013; 57: 993-1000.
- <sup>29</sup> Veatch OJ, Pendergast JS, Allen MJ et al. Genetic variation in melatonin pathway enzymes in children with autism spectrum disorder and comorbid sleep onset delay. *J Autism Dev Disord* 2015; 45:100-110.
- <sup>30</sup> Kennaway DJ, Goble FC & Stamp GE. Factors influencing the development of melatonin rhythmicity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1525-1532.
- <sup>31</sup> Kong X, Li X, Ca, Z et al. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. *Cell Mol Neurobiol* 2008; 28:569-579
- <sup>32</sup> Merchant NM, Azzopardi DV, Hawwa AF et al. Pharmacokinetics of melatonin in preterm infants. *Br J Clin Pharmacol* 2013; 76:725-733.
- <sup>32</sup> Tordjman S, Najjar I, Bellissant E et al. Advances in the research of melatonin in autism spectrum disorders: literature review and new perspectives. *Int J Mol Sci* 2013; 14:20508-20542.
- <sup>33</sup> Bastien CH, Vallieres A, & Morin CM. Validation of the Insomnia Severity Index as an outcome measure for insomnia research. *Sleep Med* 2001; 2:297-307. ■