

# کمبود پیرووات کیناز در افراد کمخون شهر بندرعباس

دکتر مجید یاوریان<sup>۱</sup>، دکتر غلامرضا فرشیدفر<sup>۲</sup>، فریده پران<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> استادیار گروه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی شیراز، <sup>۲</sup> استادیار گروه بیوشیمی، <sup>۳</sup> کارشناس آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان

مجله پزشکی هرمزگان سال دهم شماره اول بهار ۸۵ صفحات ۶-۱

## چکیده

**مقدمه:** علاوه بر کمبود آنزیم G6PD در گلبول قرمز، کمبود آنزیم پیرووات کیناز از جمله شایع‌ترین علل کمخونی همولیتیکی غیراسفروسیتیکی می‌باشد. شدت علائم بالینی کمخونی در فرم هموزیگوت این بیماری یکسان نبوده و ممکن است با کمخونی ملایم تا کمخونی مزمن و شدید همراه باشد، به نحوی که بعضی از این افراد نیاز به تزریق خون و مجبور به طحال‌برداری شوند.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی برای ۲۳۰۰ نفر در سنین بین ۱۵ الی ۳۰ سال آزمایش شمارش کامل گلبولی (CBC) انجام شد و از میان افرادی که دارای هموگلوبین کمتر از ۱۱/۵ گرم درصد بودند، تعداد ۸۰۰ مورد غیرفامیل جهت احتمال وجود کمخونی همولیتیک و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پیرووات کیناز انتخاب شدند.

**نتایج:** طیف فعالیت آنزیم بین صفر الی ۱۱/۷ U/gmHb بود. در حالی که طیف مورد انتظار در افراد طبیعی ۲/۲ الی ۹/۷ U/gmHb می‌باشد. در این گروه کمخون ۱۲۳ نفر (۱۵٪) فعالیت آنزیمی در حدود ۲۰ الی ۴۰ درصد میانگین نرمال (حد قابل انتظار برای افراد هتروزیگوت) داشتند و سه نفر دارای فعالیت آنزیمی کمتر از ۲۰٪ میانگین نرمال (حد قابل انتظار برای افراد هموزیگوت) نشان می‌دادند.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان می‌دهد فراوانی ناقلین آن ۵٪ و فراوانی ژن کمبود پیرووات کیناز در منطقه ۳۶ در هزار می‌باشد. در صورت شناسایی به موقع زوجهای در خطر کمبود پیرووات کیناز، امکان کاهش بار بیماری کمخونی مزمن ناشی از کمبود پیرووات کیناز وجود دارد.

**کلیدواژه‌ها:** پیرووات کیناز - آنمی همولیتیک مادرزادی - بندرعباس

نویسنده مسئول:  
دکتر مجید یاوریان  
گروه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی  
شیراز  
شیراز - ایران  
تلفن: ۰۹۱۷۳۶۱۲۰۵۹  
پست الکترونیکی:  
yavarian@sums.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۴/۴/۲۷ اصلاح نهایی: ۸۴/۷/۲۰ پذیرش مقاله: ۸۴/۱۰/۷

## مقدمه:

نیاز سلول می‌باشد. هر گونه اختلال آنزیمی در مسیر فوق می‌تواند موجب بروز بحران در تأمین انرژی متابولیسی سلول شده و در چنین شرایطی نهایتاً تخریب سلول (همولیز) را در پی خواهد داشت (۱).

پیرووات کیناز (۲۰۷.۱۰.۴۰) یکی از آنزیم‌های کلیدی گلیکولیز بی‌هوازی (Embden- Merhof pathway) است که به تنهایی نیمی از ATP تولید شده از این مسیر را فراهم می‌کند. در انواع سلول‌ها و در تمام گونه‌های موجودات زنده این آنزیم آلوستریک یافت می‌شود.

کمخونی‌های همولیتیکی ارثی (Hereditary Hemolytic Anemia) بطور عمده به دو گروه اسفروسیتیک (Spherocytic) و غیر اسفروسیتیک (Non-Spherocytic) طبقه‌بندی می‌گردد. از گروه اول عمدتاً بیماری‌های ناشی از اختلالات غشایی گلبول قرمز و از گروه دوم اختلالات آنزیمی شایع‌ترین علت کمخونی می‌باشد. با توجه به اینکه گلبول قرمز فاقد میتوکندری می‌باشد و تأمین انرژی از مسیر اکسیداتیو میسر نبوده و لذا مسیر گلیکولیز بی‌هوازی تنها راه تأمین ATP مورد

بررسی کمبود فعالیت آنزیم پیرووات کیناز را بعنوان دومین آنزیم محتمل در کمخونی‌های مزمن منطقه نشان می‌دهد. لذا در نخستین گام بررسی نمونه جمعیت منطقه بندرعباس انتخاب و فعالیت آنزیم پیرووات کیناز اندازه‌گیری و آزمایشات مربوطه جهت ارزیابی احتمال کمخونی مزمن ناشی از کمبود آنزیم بعمل آمد.

### روش کار:

در یک دوره ۴ ماهه نمونه خون زوجینی که جهت مشاوره قبل از ازدواج به مرکز بهداشت شهرستان بندرعباس مراجعه می‌کردند با EDTA (۱-۲ میلی گرم به ازاء هر سی‌سی خون) گرفته شد و با استفاده از دستگاه هماتولوژی آنالیزر Hycel (فرانسه) در کمتر از شش ساعت پارامترهای هماتولوژیکی گلبول قرمز (CBC) اندازه‌گیری و شمارش گردید.

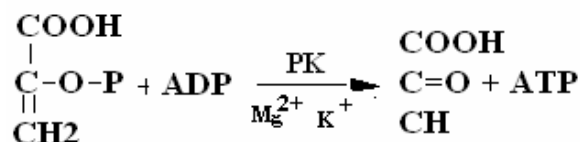
در مدت فوق از بررسی بیش از ۲۳۰۰ مورد از مراجعین به مرکز فوق در سنین ۱۵ الی ۳۱ سال و با میانگین سنی ۲۱ سال بدون در نظر گرفتن جنسیت افراد کلیه کسانی که دارای هموگلوبین کمتر از ۱۱/۵ گرم درصد داشتند، جهت بررسی کمخونی همولیتیک انتخاب گردید.

در این مطالعه تعداد ۸۰۰ نفر جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پیرووات کیناز و سایر آزمون‌های مربوط به کمخونی همولیتیک مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه‌های خون بلافاصله به مرکز تلامی بندرعباس منتقل و پلاسمای آن جهت اندازه‌گیری هاپتوگلوبین جدا و در فریز ۲۰- نگهداری شد.

Packed cell باقی‌مانده بلافاصله با محلول دکستروز ۶ درصد مخلوط و گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها آن جدا گردید. پس از حذف گلبول سفید و پلاکت گلبول قرمز سه بار با نرمال سالین شستشو و سپس همولیزات تهیه گردید. در تمام مراحل مقدماتی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پیرووات کیناز توصیه‌های کمیته بین‌المللی استانداردسازی برای هماتولوژی (ICSH) (۶) مورد

آنزیم پیرووات کیناز تبدیل فسفوانیول پیرووات (PEP) را به پیرووات کاتالیز می‌کند و در این پروسه به ازاء هر مول از PEP یک مول ATP بوجود می‌آورد.



پیرووات محصولی است که علاوه بر مسیر گلیکولیز در مسیر ارتباطی متابولیسم چربی‌ها، اسیدهای آمینه نیز قرار داشته و تنظیم آن برای سلول‌ها از نظر متابولیکی اهمیت بسزایی دارد.

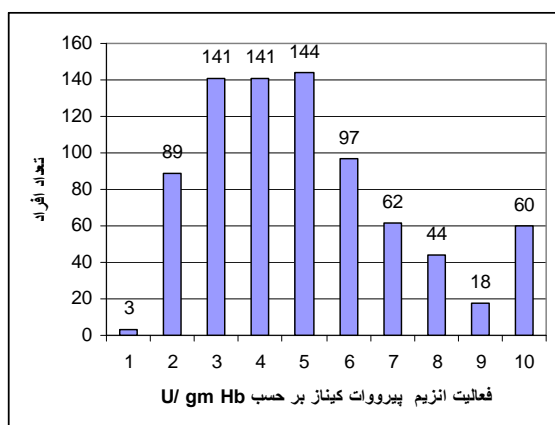
گفته می‌شود پس از کمبود آنزیم G6PD کمبود آنزیم پیرووات کیناز یکی از شایع‌ترین علت کمخونی غیراسفروسیتی می‌باشد (۲).

کمبود پیرووات کیناز که یک اختلال ژنتیکی اتوزومال مغلوب می‌باشد از نقاط مختلف دنیا گزارش شده است و عمده این گزارشات از کشورهای اروپایی و امریکایی می‌باشد. به استثنای ژاپن از کشورهای آسیای گزارش محدودی وجود دارد. فراوانی ناقلین کمبود PK در یک مطالعه از آسیای جنوب شرقی و چین سه درصد نوزادان ذکر می‌کند (۳). در امریکا یک درصد می‌باشد (۴).

از منطقه نزدیک ایران تنها یک گزارش از عربستان سعودی میزان بروز کمبود PK را ۳/۱۲٪ اعلام کرده است (۴، ۱).

فراوانی کمبود در بین اقوام گوناگون یک کشور نیز یکسان نمی‌باشد. برای مثال در بین اقوام موسوم به آمیشن در منطقه پنسیلوانیا نسبت به سایر نقاط امریکا از شیوع بیشتری برخوردار می‌باشد (۵).

تاکنون هیچ مطالعه ثبت شده‌ای از وضعیت این آنزیم در ایران وجود ندارد. وجود تعداد افراد قابل ملاحظه‌ای که دارای هموگلوبین کمتر از ۱۱/۵ گرم در صد در میان مراجعین مشاوره ازدواج (۳۴/۸٪) (مطالعه منتشر نشده- یاوریان) و همچنین شیوع حدود ۲۲ درصدی کمبود G6PD در مردان استان هرمزگان (۱، ۵)، ضرورت



نمودار شماره ۱- توزیع فراوانی فعالیت آنزیم در ۸۰۰ نفر  
مورد بررسی در ناحیه بندرعباس

در بررسی انجام شده، ۱۲۶ نفر دارای فعالیت آنزیمی کمتر از ۲/۲ U/gmHb و شمارش رتیکولوسیت بین ۱/۲ الی ۱۷٪ بودند. در افراد کمخونی که فعالیت آنزیم PK در حد طبیعی داشتند، شمارش رتیکولوسیت ۰/۲ الی ۴٪ مشاهده گردید.

ارزیابی هاپتوگلوبین با روش الکتروفورزیس در افرادی که فعالیت آنزیمی PK ۲۰ الی ۴۰٪ نرمال داشتند، نشان می‌دهد مقدار هاپتوگلوبین بطور متوسط ۸٪ کمتر از میانگین افراد نرمال و این کاهش در سه موردی که فعالیت PK کمتر از ۲۰٪ نرمال داشتند مقدار هاپتوگلوبین کمتر از ۱۰٪ نرمال مشاهده گردید.

طیف تغییرات میانگین حجم گلبول قرمز (MCV) در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

جدول شماره ۲- توزیع پراکندگی MCV بر حسب فمتولیت در ۸۰۰ مورد

گروه فعالیت آنزیمی	تعداد	میانگین (فاصله اطمینان ۹۵ درصد)
گروه فعالیت آنزیمی نرمال	۶۷۴	۶۴ (۵۱-۷۰)
گروه فعالیت آنزیمی ۲۰-۴۰٪ نرمال	۱۲۳	۷۷ (۷۰-۹۳)
گروه فعالیت آنزیمی کمتر از ۲۰٪ نرمال	۳	۸۹ (۷۵-۱۰۱)

توجه کامل قرار داده شد. شمارش رتیکولوسیت با روش استاندارد تهیه و شمارش گردید (۷).

روش اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پیرووات کیناز با روش پیشنهادی ICSH (۶) انجام و برحسب U/gmHb محاسبه گردید. غلظت مواد در یک میلی‌لیتر واکنش در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. کلیه مواد و همچنین آنزیم LDH از شرکت Sigma تهیه گردید. برای برآورد مقدار هاپتوگلوبین از روش الکتروفورز بر روی سلولوز استات استفاده گردید (۸).

جدول شماره ۱- غلظت مواد در محلول واکنش فعالیت آنزیم پیرووات کیناز

غلظت بکار گرفته شده	مواد مورد مصرف
۰/۳ میلی مول	Tris-Hcl pH 8.0
۰/۳ میلی مول	KCL
۰/۰۳ میلی مول	MgCl <sub>2</sub>
۰/۶ میکرو مول	NADH
۱۸ واحد	Lactate dehydrogenase
۰/۷۵ میکرومول	ADP
۰/۴۵ میکرومول	PEP

### نتایج:

با بررسی بیش از ۲۳۰۰ مورد CBC بدون در نظر گرفتن جنسیت افراد در مجموع ۸۰۰ نفر با هموگلوبین کمتر از ۱۱/۵ gm/dl که دارای شمارش گلبول قرمز (RBC) آنها کمتر از ۵ میلیون در میلی‌متر مکعب داشتند جهت بررسی بیشتر انتخاب گردید. در بین این افراد کمخون، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در گلبول قرمز، فعالیتی بین ۰/۱ الی ۱۱/۷ U/gmHb را نشان می‌داد در حالی که در ۶۵ نفر افراد سالم گروه کنترل فعالیت آنزیم بین ۲/۲ الی ۹/۷ U/gmHb داشتند. بیشترین تعداد افراد فعالیتی بین ۲ تا ۵ U/gmHb نشان می‌دهند (توزیع پراکندگی ۸۰۰ مورد در نمودار ۱).

## بحث و نتیجه‌گیری:

آنزیم پیرووات کیناز پروتئینی است تترامر که هر چهار زنجیره آن مشابه هم بوده و بر حسب ژن عامل هر زنجیره از حدود پانصد الی ششصد اسید آمینه تشکیل می‌گردد (۹). هر زنجیره دارای چهار دومین می‌باشد و همین دومین‌ها توانایی ساختاری لازم برای تنظیم فعالیت آلوسترکی را فراهم می‌سازد (۱۰). همچون سایر آنزیم‌های آلوستریک نسبت به عوامل متعدد تأثیرپذیر می‌باشد (۹). اتصال فسفوانیول پیرووات موجب فعال شدن آنزیم شده و فروکتوز ۱/۶ دی فسفات و PH اسیدی سبب تقویت مثبت آن (۱۱) ولی ATP، اسید آمینه‌های آلانین و فنیل آلانین سبب مهار فعالیت آن می‌گردد (۱۲). گفته شده پروتئولیز موجبات فعال شدن آنزیم پیرووات کیناز را فراهم می‌کند (۱۳) ولی هورمون سبب دیمریزه شدن (۱۴) و بالاخره فسفوریله شدن آنرا غیر فعال می‌کند (۱۵).

علاوه بر کنترل در سطح آنزیمی در سلول‌های هسته‌دار ژن پیرووات کیناز (PK-gene) نیز تحت تأثیر عوامل متعدد القایی و یا مهاری ساخت آنزیم را کنترل می‌نماید. این آنزیم سیتوزولی در انسان توسط دو ژن کنترل و ساخته می‌شود. این دو ژن مسئول سنتز چهار ایزوform آنزیم می‌باشد.

ژن مربوط به ایزوform PK-M1, PK-M2 در روی بازوی بلند (q ۲۲) کروموزوم ۱۵ (۱۶) و ژن مربوط به ایزوform های PK-L, PK-R روی بازوی بلند (۲۱q) کروموزوم شماره یک قرار دارد. به استثنای نورموبلاست‌ها که قادر به فعال کردن ژن PK-M می‌باشد در گلبول قرمز تنها فرم موجود PK-R می‌باشد. تاکنون ۱۵۰ موتاسیون در ژن PK-LR شناسایی شده است (۱۷) که عمدتاً در ساختمان پروتئینی آنزیم اثر کرده و موجب تغییرات در کنتیک آنزیم شده (کاهش میل به سوبسترا - افزایش اثر مهاری محصول - کاهش پاسخ به فعال کننده‌ها) و یا پایداری ساختمان چهارم آنزیم را کاهش می‌دهد. اما تعدادی از موتاسیون‌ها نیز وجود دارد که ساخت آنرا کاهش و یا متوقف می‌نمایند. کاهش کمی و یا کیفی فعالیت

PK همراه است با کاهش سطح ATP است که اختلال در پمپ الکترولیت گلبول قرمز و افزایش آسیب‌پذیری غشایی آنرا فراهم می‌نماید (۱۸).

کمبود PK یک اختلال اتوزومال مغلوب می‌باشد و اغلب افراد هتروزیگوت معمولاً علائم بالینی خاصی نشان نمی‌دهند و فعالیت آنزیمی در این گروه بین ۲۰٪ الی ۴۰٪ میانگین آنزیم طبیعی است. کمخونی در افراد هموزیگوت با شدت و ضعف متفاوتی دیده می‌شود که بستگی تامی به نوع جهش ژنی و بازتاب مولکولی آن در ساختمان آنزیم دارد و فعالیت آنزیمی در این گروه کمتر از ۲۰٪ میانگین افراد سالم می‌باشد. معمولاً افراد هموزیگوت کمخونی متوسطی دارند ولی در عده‌ای با کمخونی شدید ظاهر می‌گردد که نیازمند تزریق خون می‌باشند و حتی ممکن است منجر به اسپلنکتومی می‌گردد. یرقان نوزادان و حتی هیدروپس فتالیس ناشی از عوارض کمبود هموزیگوت PK دیده می‌شود (۱۹).

در گروه تحت مطالعه کمترین میزان هموگلوبین مشاهده شده در افراد هتروزیگوت ۹/۲ و در هموزیگوت ۷/۴ می‌باشد. به علت افزایش DPG به میزان ۲/۳ و شیب منحنی تفکیک هموگلوبین به راست، شدت در مقایسه با بیماران دیگر با سطح هموگلوبین مشابه، علایم هیپوکسی ناشی از کمخونی بسیار خفیف می‌باشد.

از نظر مورفولوژی گلبول قرمز در کمبود PK اغلب نورموسیتیک ولی در کمخونی همراه با ماکروسیتوز می‌باشد که به علت افزایش رتیکولوسیت در این بیماران می‌باشد. MCV و Reticulocyte در گروه کم خون در جدول نشان داده شده است. در رتیکولوسیت با افزایش شش الی هفت برابر در فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری، ATP مورد نیاز سلول را فراهم می‌نماید (۲۰).

طیف فعالیت آنزیم بین صفر الی ۱۱/۷ U/gmHb بود در حالیکه طیف مورد انتظار در افراد طبیعی ۲/۲ الی ۹/۵ U/gmHb می‌باشد. هر چند احتمال وجود موتاسیون در ژن افرادی که فعالیت آنزیمی بیشتر از ۹/۵ داشتند، وجود دارد ولی توجیه کمخونی (هموگلوبین کمتر از ۱۱/۵ gm/dl) نمی‌تواند در ارتباط با فعالیت آنزیم باشد و

نتیجه: بررسی گسترده در استان مالاریاخیز برای ارزیابی کمبود پیرووات کیناز در منطقه، توجه به یرقان نوزادان و توجه به احتمال کمخونی مزمن ناشی از آن در کلینیک و مشاوره‌های ژنتیکی می‌تواند کمک زیادی در کیفیت ارائه خدمات پزشکی داشته باشد.

### سپاسگزاری:

هزینه این طرح از محل پروژه شماره ۸۳۱۹ به تاریخ ۸۲/۱۲/۵ مدیریت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان پرداخت گردید. ضمن تشکر و قدردانی از آن مدیریت از همکاری صمیمانه آزمایشگاه مرکز بهداشت شهرستان بندرعباس و مدیریت آن در طی انجام این طرح سپاسگزاری می‌گردد.

محتمل است با توجه به اینکه گلبول سفید فعالیت آنزیمی PK شش برابر گلبول قرمز است همولیزات در این گروه دارای بقایایی از گلبول سفید بوده باشد.

در این گروه کمخون ۱۲۳ نفر (۱۵٪) فعالیت در حدود ۲۰ الی ۴۰ درصد (حد قابل انتظار برای افراد هتروزیگوت) داشتند. بنابراین شیوع PK در جمعیت منطقه بندرعباس ۵٪ می‌باشد که نسبت به گزارش موجود حتی از عربستان سعودی نیز تا حدودی بالاتر می‌باشد.

گفته شده کمبود PK بدلیل موجب مقاومت نسبی به مالاریا می‌گردد. با توجه به مالاریاخیز بودن منطقه احتمال گزینش اصلح موجب گردیده علاوه بر شیوع انواع تالاسمی کمبود G6PD و PK نیز در این ناحیه از شیوع بیشتری برخوردار باشد. اگر سه موردی که فعالیت آنزیمی کمتر از ۲۰٪ داشتند هموزیگوت برای کمبود PK فرض شوند، فراوانی ژن کمبود پیرووات کیناز در منطقه ۳۶ در هزار خواهد بود.

## References

## منابع

1. Miwa S, Fujii H. Molecular basis of erythroenzymopathies associated with hereditary hemolytic anemia: tabulation of mutant enzymes. *Am J Hematol.* 1996;51(2):122-132.
2. Valentine WN, Tanaka KR, Paglia DE. Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies. *Ann Intern Med.* 1985;103(2):245-257.
3. Fung RH, Keung YK, Chung GS. Screening of pyruvate kinase deficiency and G6PD deficiency in Chinese newborn in Hong Kong. *Arch Dis Child.* 1969; 44(235):373-376.
4. Tanaka KR, Zerez CR. Red cell enzymopathies of the glycolytic pathway. *Semin Hematol.* 1990; 27(2):165-185.
5. Abu-Melha AM, Ahmed MA, Knox-Macaulay H, Al-Sowayan SA, el-Yahia A. Erythrocyte pyruvate kinase deficiency in newborns of eastern Saudi Arabia. *Acta Haematol.* 1991;85(4):192-194.
6. Kanno H, Ballas SK, Miwa S, Fujii H, Bowman HS. Molecular abnormality of erythrocyte pyruvate kinase deficiency in the Amish. *Blood.* 1994; 83(8):2311-2316.
7. یاوریان مجید، فرشیدفر غلامرضا، صفا امید. میزان شیوع G6PD در جمعیت مردان استان هرمزگان. مجله پزشکی هرمزگان، سال پنجم، شماره اول، ۱۳۸۰: ص ۱۱ - ۷
8. Miwa S. Pyruvate kinase variants characterized by the methods recommended by the international committee for standardization in haematology. *Hemoglobin.* 1980; 4(5-6):627-633.
9. Dacie JV, Lewis SM. Practical hematology. 5<sup>th</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1975.
10. Brus I, Lewis SM. The haptoglobin content of serum in haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 1959;5:348-355.
11. Fothergill-Gilmore LA, Michels PA. Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Mol Biol.* 1993; 59(2):105-235.

12. Rigden DJ, Phillips SE, Michels PA, Fothergill-Gilmore LA. The structure of pyruvate kinase from *Leishmania Mexicana* reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity. *J Mol Biol.* 1999; 291(3):615-635. Erratum in: *J Mol Biol.* 1999; 293(3):745-749.
13. de Arriaga D, Busto F, del Valle P, Soler J. A kinetic study of the pH effect on the allosteric properties of pyruvate kinase from *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 998(3):221-230.
14. Kahn A, Marie J. Pyruvate kinases from human erythrocytes and liver. *Methods Enzymol.* 1982; 90 Pt E:131-140.
15. Marie J, Kahn A. Proteolytic processing of human erythrocyte pyruvate kinase: study of normal and deficient enzymes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979; 91(1):123-129.
16. Ashizawa K, McPhie P, Lin KH, Cheng SY. An in vitro novel mechanism of regulating the activity of pyruvate kinase M2 by thyroid hormone and fructose 1,6-bisphosphate. *Biochemistry.* 1991; 30(29):7105-7111.
17. El-Maghrabi MR, Claus TH, McGrane MM, Pilkis SJ. Influence of phosphorylation on the interaction of effectors with rat liver pyruvate kinase. *J Biol Chem.* 1982; 527(1):233-240.
18. Tani K, Yoshida MC, Satoh H, Mitamura K, Noguchi T, Tanaka T, et al. Human M2-type pyruvate kinase: cDNA cloning, chromosomal assignment and expression in hepatoma. *Gene.* 1988;73(2):509-516.
19. Ferreira P, Morais L, Costa R, Resende C, Dias CP, Araujo F, et al. Hydrops fetalis associated with erythrocyte pyruvate kinase deficiency. *Eur J Pediatr.* 2000;159(7):481-482.
20. Keitt AS. Pyruvate kinase deficiency and related disorders of red cell glycolysis. *Am J Med.* 1966; 41(5):762-785.