대한간학회지 제 7 권 제 1 호 2001 ; 55 - 60

간성 뇌증의 치료로서 Rifaximin (Normix®) 단기간 투여의 효능과 안전성

연세대학교 의과대학 내과학교실, 소화기병연구소[1]

김명환 ·한광협 ·이관식 ·백용한 ·송건훈
나호균 ·문병수 ·윤석화[1] ·전재윤 ·문영명 ·박인서

Abstract

Efficacy and Safety of Short-term Administration of Rifaximin in the Treatment of Hepatic Encephalopathy

Myoung Hwan Kim, M.D., Kwang Hyub Han, M.D., Kwan Sik Lee, M.D., Yong Han Paik, M.D., Kun Hoon Song, M.D., Ho Kyun Na, M.D., Byung Soo Moon, M.D., Suk Hwa Yoon, R.N[1]., Chae Yoon Chon, M.D., Young Myoung Moon, M.D. In Suh Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Institute of Gastroenterololgy[1]
Yonsei University, College of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: A prospective, randomized study was performed to evaluate the efficacy and safety of the short-term administration of rifaximin in the treatment of hepatic encephalopathy. **Methods**: Of the 64 patients diagnosed as having decompensated liver cirrhosis with hepatic encephalopathy, 39 patients were randomized to receive rifaximin and 25 patients to receive lactulose for seven days. Before and after the treatment we assessed changes in the level of serum ammonia, flapping tremor, patient's mental status, number connection test (NCT), and hepatic encephalopathy indices. **Results**: In rifaximin-treated group, the mean grade of serum ammonia (1.8→0.9), mental status (1.3→0.3), NCT (3.0→2.0), and flapping tremor (1.7→0.4) were improved after treatment. In the lactulose-treated group, the mean grade of serum ammonia (1.9→1.0), mental status (1.5→0.5), NCT (3.3 →2.1), and flapping tremor (1.4→0.3) were improved after treatment. Side effects of abdominal pain (rifaximin group) and excessive diarrhea (lactulose group) were noted in 2 cases. The efficacy of treatment was not significantly different between rifaximin and lactulose-treated groups (84.3% vs. 95.3%). **Conclusion**: Rifaximin was as efficient and safe in the treatment of hepatic encephalopathy as lactulose in terms of efficacy. Rifaximin may be useful drug for the short-term treatment of hepatic encephalopathy.**(Korean J Hepatol 2001;7:55-60)**

Key Words: Rifaximin, Hepatic encephalopathy

◇ 접수 2000년 9월 25일; 수정본 접수 2000년 12월 13일; 승인 2001년 1월 8일
◇ Abbreviations: HE, hepatic encephalopathy; NCT, number connection test
◇ 책임저자 : 한광협, 연세대학교 의과대학 내과학교실 서울특별시 서대문구 신촌동 134번지 (우) 120-752
Phone: 02) 361-5433; Fax: 02) 393-6884; E-mail: gihankhys@yumc.yonsei.ac.kr

※ 본 논문은 제 6차 대한 간학회 춘계학술대회에서(2000년 6월) 구연 발표되었음.
※ 본 논문은 아주약품(주)의 임상연구비의 지원으로 연구되었음.

서 론

간성 뇌증은 급,만성으로 간기능이 저하된 환자에서 발생하는 신경정신학적 증후군으로 의식장애, 인성 및 지적능력장애, 신경근활동의 변화 및 비정상 EEG가 특징이다.[1] 간경변 시 저하된 대사기능에 기인한 고암모니아혈증이 중요한 역할을 하며 주로 장관 내 질소화합물이 호기성, 혐기성 균에 의해 분해될 때 생성된다. 간성 뇌증의 치료를 위해서는 암모니아 생성물질 감소, 암모니아의 생성억제, 흡수감소, 배설촉진이 목표가 된다. 치료로는 비흡수성 항생제의 투여나 lactulose 투여가 효과인 것으로 알려져 있다. 그러나 비흡수성 항생제인 neomycin은 장관에서 소량이 흡수되지만 장기 사용의 경우 신독성과 이독성을 초래할 수 있다. 또한 lactulose는 비흡수성 이당체이며 삼투성 하제로 작용하여 암모니아의 흡수저하 및 배설을 유도하며 장내세균 대사에 직접적인 영향을 주어 암모니아 생성을 감소시킨다. 그러나 설사, 탈수 등 합병증이 있어 사용에 제약이 있을 수 있다.[2,3]

Rifaximin (Normix®)은 광범위한 항균력을 가지며 장관에서 흡수되지 않는 rifamycin 계열의 macrolide계 항생제로 간성 뇌증의 치료에 유용하다는 보고되었다.[4] 그러나, 이 약제에 대한 단독투여나 단기간 투여의 효과에 대하여 연구 보고된 적은 없다. 따라서, 본 연구에서는 고암모니아혈증을 동반한 간성 뇌증의 치료로서 rifaximin 단기간 투여의 효능과 안전성을 알아보고자 lactulose 경구투여와 비교하여 무작위 추출에 의한 전향적 연구를 시행하였다.

대상과 방법

1. 연구대상

1997년 1월부터 1998년 12월까지 연세대학교 신촌세브란스병원과 영동세브란스병원에 입원한 비대상성 간경변 환자 중 혈중 암모니아치 75 μg/dL 이상의 고암모니아혈증이 동반된 Grade I-III의 간성 뇌증 환자 64명을 대상으로 하였다. 중추신경질환을 가진 환자, rifamycin이나 이당체에 과민한 환자, 장폐색증 또는 중증의 염증성 장질환 환자, 시험 전 12시간 이내에 이뇨제, 제산제, 하제등 병용불가 약물을 투여받은 환자, 시험 전 7일 이내에 항생제를 투여받은 환자, 뇌증 유발성 약제로 처치중인 환자 및 관찰자와 협조를 이행할 수 없다고 판단되는 환자는 제외하였다. 따라서 64명의 환자 중 10명의 환자가 대상에서 제외되었고 총 54명이 최종적으로 연구대상에 포함되었다.

대상환자들의 간성 뇌증의 횟수로는 초회인 경우가 26예, 재발성이 28예였다. 간성 뇌증의 유발요인으로는 단백질 섭취과잉이 10예, 탈수가 13예, 복막염 등의 세균감염이 5예, 변비가 10예, 소화관 출혈이 3예, 원인불명이 13예였다. 각 환자와 보호자에게는 본 연구의 취지와 목적에 대하여 설명하였으며, 서면동의를 받은 뒤 연구에 포함시켰다.

2. 연구방법

대상 환자들은 3 : 2 무작위 추출법을 통하여 rifaximin 투여군(32명)과 lactulose 투여군(22명) 중 한 군으로 배정되어 rifaximin 투여군은 일일 1200 mg #3으로, lactulose 투여군은 일일 90 mL #3으로 7일 간 경구투여하였다. 대상 환자들은 치료 전후의 혈중 암모니아 농도, 간성 뇌증 등급, 퍼덕이기 진전(flapping tremor), 숫자연결 검사의 결과치를 등급화하였으며, 치료 전후의 일반혈액검사, 간기능검사, 신기능검사 및 혈당검사, 뇨검사를 시행하여 비교하였다. 간성 뇌증 등급은 Conn 등의 의해 수정된 Parsons-Smith 반정량적 등급에 따라 Grade 0에서 Grade IV까지 5등급으로 나누었다.[5] 퍼덕이기 진전은 Grade 0 (없음), Grade I (±), Grade II (계속적), Grade III (수행할 수 없음)의 4등급으로,[6] 숫자연결 검사는 Grade 0 (<30초), Grade I (31-50초), Grade II (51-80초), Grade III (81-120초), Grade IV (<121초 또는 수행할 수 없음)의 5등급으로 나누었다.[7,8] 혈중 암모니아 농도는 Grade 0 (<75 μg/dL), Grade I (76-150 μg/dL), Grade II (151-200 μg/dL), Grade III (201-250 μg/dL), Grade IV (>251 μg/dL)의 5등급으로 나누었다.[9]

Table 1. Clinical and Laboratory Characteristics of the Patients

	Rifaximin (N=32)	Lactulose (N=22)	*p* value
Age (yr)	56.2±7.1	54.9±6.6	NS
Male/Female	24 : 8	13 : 9	NS
Albumin (g/dL)	2.82±0.45	3.08±0.49	NS
Bilirubin (mg/dL)	5.85±5.23	5.13±6.08	NS

치료에 대한 평가는 치료시작과 종료 시의 간성 뇌증 지수의 변화를 비교, 평가하였다.

간성뇌증 지수(H.E. index)=[간성 뇌증 등급(0-4)]×3+숫자연결 검사등급(0-4)+퍼덕이기 진전 등급(0-3)+혈중 암모니아농도의 등급(0-4) [0-23점][9]

치료전후의 간성 뇌증 지수의 변화에 따라 지수가 1점 이상 감소한 경우는 향상으로 정의하였고, 간성 뇌증 지수의 변화가 없었던 경우는 무변화로 정의하였다. 지수가 1점 이상 증가한 경우는 악화로 정의하였으며, 간성 뇌증이 악화되거나 상부 위장관 출혈 또는 자발성 세균성 복막염 등 간경변의 합병증으로 인하여 치료를 중단한 경우, 심각한 부작용이 발생한 경우, 환자가 치료의 진행을 거부한 경우는 치료중단으로 정의하였다.

통계처리는 윈도우용 SAS (Statistical Analysis System) Version 6.12를 사용하였다. 인구학적 기초자료의 검정은 Student's t-test를 이용하였고, 치료효과를 검정하기 위하여 시험시작 전과 시험종료 후에 얻어진 간성 뇌증 지수를 paired t-test를 사용하여 분석하였으며, 양 군 간의 간성 뇌증 지수를 비교하기 위하여 chi검정을 사용하였고, 양 군 간의 차이를 분석하기 위하여 로지스틱 회귀분석을 사용하였다.

결 과

1. 양 군간의 임상상의 비교

총 54명의 환자를 rifaximin 투여군 32명과 lactulose 투여군 22명으로 나누었으며, 대상환자 전체의 평균연령은 55.7세(40-71)였고, 남녀는 각각 37명, 17명이었으며 양 군 간의 평균연령, 남녀비, 알부민, 빌리루빈, 크레아티닌 치 등에 차이는 없었다(표 1).

2. 치료 전후 간성 뇌증의 비교

Rifaximin 투여군에서 치료 전후를 비교하면 치료 종료 시 혈중 암모니아 농도는 1.8등급에서 0.9등급으로, 간성 뇌증 등급은 1.3등급에서 0.3등급으로, 퍼덕이기 진전은 1.7등급에서 0.4등급으로, 숫자연결 검사는 3.0등급에서 2.0등급으로, 간성 뇌증 지수는 10.5점에서 4.2점으로 모두 유의하게 호전되었다(표 2). Lactulose 투여군에서도 치료전후를 비교하면 치료 종료 시 혈중 암모니아 농도는 1.9등급에서 1.0등급으로, 간성 뇌증 등급은 1.5등급에서 0.5등급으로, 퍼덕이기 진전은 1.4등급에서 0.3등급으로, 숫자연결 검사는 3.3등급에서 2.1등급으로, 간성 뇌증 지수는 11.3점에서 5.0점으로 모두 유의하게 호전되었다. 치료 전후의 혈중 암모니아 농도, 간성 뇌증 등급, 진전, 숫자연결 검사치의 변화정도는 양 군 간에 차이가 없었다(표 2).

Table 2. Comparison of Clinical Parameters between the Two Groups

	Rifaximin			Lactulose		
	Pre Tx	Post Tx	*p* value	Pre Tx	Post Tx	*p* value
Serum ammonia	1.8±0.9	0.9±0.9	<0.01	1.9±0.9	1.0±0.9	<0.01
HE grade	1.3±0.7	0.3±0.4	<0.01	1.5±0.8	0.5±0.7	<0.01
Asterixis	1.7±0.8	0.4±0.6	<0.01	1.4±0.8	0.3±0.7	<0.01
NCT	3.0±1.0	2.0±1.2	<0.01	3.3±0.9	2.1±1.1	<0.01
HE index	10.0±3.9	4.2±2.7	<0.01	11.3±3.9	5.0±4.1	<0.01

HE, hepatic encephalopathy; NCT, number connection test;
HE index = HE index X 3 + NCT + asterixis + serum ammonia (0-23점).
The efficacy of treatment was not significantly different between two groups.

Table 3. Comparison between the Two Groups According to Serum Ammonia, HE Grade and HE Index

	Rifaximin (N=32)	Lactulose (N=22)	*p* value
Improvement of serum anmmonia	25(78%)	13(59%)	0.13
Improvement of HE grade	26(81%)	16(72%)	0.51
HE index			
Improvement	27(84.3%)	21(95.4%)	NS
Unchanged	2(6.2%)	1(4.5%)	NS
Progression	3(5.5%)	0(0%)	NS

NS, not significant.

3. 치료 후 양 군 간의 간성 뇌증의 호전 빈도별 비교

치료 후 혈중 암모니아 농도와 간성 뇌증의 등급이 향상된 환자는 rifaximin 투여군에서 각각 25예(78%), 26예(81%)이었고, lactulose 투여군에서 각각 13예(59%), 16예(72%)였다. 치료 후 rifaximin 투여군의 84.3%, lactulose 투여군의 95.4%에서 간성 뇌증 지수가 향상되었으며 양 군 간에 유의한 차이가 없었다(표 3).

4. 부작용

총 64명의 환자가 치료를 시작하였으나 10명의 환자에서 제외기준이 발생하여 치료를 중단하였다. 치료를 완료한 54명의 환자 중에서 나타난 부작용으로서 rifaximin 투여군에서 복통이 1예 있었으며, lactulose 투여군에서는 과도한 설사가 1예 있었다. 그러나 신기능의 저하를 보인 환자는 없었다.

고 찰

Rifaximin은 rifamycin의 반합성 유도체로 그람 양성 및 음성균에 대해 광범위한 살균작용을 나타낼 뿐 아니라 타 항생제에 비해 병원균에 대한 내성 비율이 극히 적고 교차내성도 거의 없는 것으로 보고되고 있다. 또한 위장관에서 거의 흡수되지 않는 독특한 약물 동력학적 작용을 지녀 경구투여 시 위장관에 고농도의 활성상태로 존재하여 *Salmonella, E. coli* 등 각종 장내세균을 박멸하는데 우수한 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 체내에서 거의 대사되지 않고 활성형으로 분변중으로 배설되어 전신 및 국소 부작용도 적은 제제이며 neomycin과 비교하여 신독성을 나타내지 않는 장점이 있다.[4] 또한 급,만성 장염, 감염성 설사, 복부수술 전후 패혈증의 예방에 유효하며, 암모니아 생성균 억제작용 및 질소분해 촉진작용으로 간성 뇌증에 보조요법으로 사용된 보고가 있다.[4]

본 연구결과에서는 병용치료를 했거나 15일 간의 치료를 한 앞서의 보고들에 비해 7일의 단기간 동안 rifaximin을 단독투여하여 lactulose 단독투여를 한 환자와의 간성 뇌증의 호전양상을 비교하였다. 치료 후 혈중 암모니아 농도와 간성뇌증의 등급이 향상된 환자는 rifaximin 투여군에서 각각 25예(78%), 26예(81%), lactulose 투여군에서 각각 13예(59%), 16예(72%)였으며 치료 전후의 혈중 암모니아 농도, 간성 뇌증 등급, 퍼덕이기 진전, 숫자연결 검사치는 양군간의 차이가 없었다. 치료 후 rifaximin 투여군의 84.3%, lactulose 투여군의 95.4%에서 간성 뇌증 지수가 향상되었으며 양 군 간에 유의한 차이는 없었다. 즉 치료 전 간성 뇌증의 중증도는 양 군 간에 차이가 없으며, 치료 후의 호전 정도도 비슷하여 양 군 모두 치료의 효과는 유사하였다.

종래의 보고들과 비교하여 보면 단독투여 및 병용투여의 경우 15일 또는 21일 간 치료 후의 간성 뇌증의 호전이 rifaximin 투여군에서 neomycin, lactulose 등 비교약물 투여군에 비해 유사하거나 우수한 결과를 나타내었다. DiPiazza 등과 Pedretti 등은 간성 뇌증을 가진 간경변 환자에서 rifaximin과 neomycin을 lactulose와 함께 병용투여하여 rifaximin을 투여한 환자에서 치료율이 높았음을 보고하였다.[10,11] Massa 등은 40명의 간성 뇌증 환자에서 각각 rifaximin과 lactulose를 15일 간 투여한 결과 rifaximin 투여군에서 투여 6일째,

lactulose 투여군에서 투여 9일째 간성 뇌증이 호전되었음을 보고하였고,[12] Bucci 등은 30명의 간성 뇌증 환자를 대상으로 rifaximin과 lactulose를 15일 간 투여하여 각각 lactulose와 rifaximin을 투여한 환자들에서 유사한 효과를 나타내어 rifaximin 단독투여의 효과를 보고하였다.[13] 단기간 rifaximin 투여의 효과를 조사한 연구로는 Puxeddu 등이 55명의 간성 뇌증을 가진 간경변 환자를 대상으로 6일 간 rifaximin과 lactulose를 병용투여하여 부작용 없이 암모니아 생성 균주를 효과적으로 감소시키는 데 상승작용이 있음을 보고하였다.[14] 장기간 rifaximin 투여의 효과를 조사한 연구로는 Miglio 등이 49명의 환자를 대상으로 6개월 간 치료후 rifaximin 투여군과 neomycin 투여군을 비교하였는데, 양군 모두 혈청 암모니아가 감소하였고 간성 뇌증이 호전되었으며 양 군 간의 통계적 차이는 없음을 보고하였다.[15] 본 연구의 결과는 7일 동안 단기간 투여시 lactulose 투여군(95.4%)이 rifaximin 투여군(84.3%)보다 다소 효과가 높으나 통계적으로 유의한 차이가 없어 rifaximin의 단기간 투여시에도 상기의 보고들과 유사한 결과를 나타냈다.

한편 치료 도중 제외 기준이 발생했거나 치료를 완료하지 못한 환자들은 10명이며 각각 이뇨제 등 비허용약물의 사용, 신경계질환이 동반된 경우, 환자와 보호자의 치료중단 요구 등이 원인이었다. 예측할 수 있는 부작용으로는 초회 투여시 오심이 나타날 수 있으며 고용량으로 장기간 투여시 담마진양 피부반응이 나타날 수 있지만 가능성은 매우 적어 실제로 발생한 경우도 없었으며 본 연구에서는 단기간 투여이므로 나타나지 않았다. Miglio 등의 연구에서 25명의 rifaximin 투여환자에서 오심과 소화장애가 각각 1예씩 보고되었다.[15] 본 연구에서는 39명의 rifaximin 투여환자 중에서 복통이 1예 관찰되었으며, 25명의 lactulose 투여환자 중 심한 설사가 1예 보고되었다.

결론적으로, 간경변 환자에서 발병된 간성 뇌증의 치료에 있어서 rifaximin을 투여 시 유의하게 간성 뇌증이 호전되었다. Lactulose의 효능과 비교하였을 때 치료 반응률, 부작용 등에서는 양 군 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 따라서 간경변 환자에서 발병된 간성 뇌증의 단기 치료에 있어서 rifaximin의 효능은 lactulose와 유사하며 부작용도 적어 안전한 약물이라 할 수 있다. 그러나 장기간 치료에 있어서의 효능과 부작용에 대한 연구가 필요하겠다.

요 약

목적: 본 연구에서는 간성 뇌증의 치료에서 단기간 rifaximin투여의 효능과 안전성을 알아보고자 무작위 추출법에 의한 경구 lactulose 치료와의 전향적 비교연구를 시행하였다. **대상과 방법:** 비대상성 간경변과 혈중 암모니아치 75 g/dL 이상의 고암모니아혈증이 동반된 Grade I-III의 간성 뇌증 환자 54명을 대상으로 하였다. 신경계 질환이 있거나 뇌증 유발성 약제를 처치중인 환자, 시험전 7일 이내에 항생제를 투여한 환자는 제외하였다. 대상 환자를 rifaximin 투여군(32명)과 lactulose 투여군(22명)으로 구분하여 7일 간 치료한 후 치료 전후의 혈중 암모니아 농도, 의식상태, 퍼덕이기 진전, 숫자연결 검사, 간성 뇌증 지수의 변화를 비교하였으며, 치료종료 시의 양군의 효능 및 안전성을 비교, 평가하였다. **결과:** 1) 대상환자들의 평균연령은 55.7세(40-71)였고, 남녀는 각각 37명, 17명이었으며 양 군 간의 유의한 차이는 없었다. 2) Rifaximin 투여군에서 치료종료 시 혈중 암모니아 농도, 의식상태, 퍼덕이기 진전, 숫자연결 검사, 간성 뇌증 지수는 모두 호전되었다. 3) Lactulose 투여군에서도 치료종료 시 혈중 암모니아 농도, 의식상태, 퍼덕이기 진전, 숫자연결 검사, 간성 뇌증 지수는 모두 호전되었다. 4) 치료 후 혈중 암모니아치, 의식상태가 호전된 환자의 비율은 rifaximin투여군에서 각각 78%, 81%였고, lactulose 투여군에서는 각각 59%, 72%였다(P=0.132). 5) 양군에서 부작용으로 인한 치료실패는 각각 1예가 있었다(P=0.84). 6) 최종적으로 간성 뇌증 지수의 호전은 rifaximin 투여군에서 84.3%, lactulose 투여군에서 95.4%로 나타났다(P=0.383). **결론:** 간경변 환자에서 고암모니아

혈증을 동반한 간성 뇌증의 단기 치료에 있어서 rifaximin의 효능은 lactulose와 유사하며 부작용도 적어 비교적 안전한 약물이라 할 수 있다.

색인단어: 간성 뇌증, Rifaximin

참 고 문 헌

1. Greg F. Systemic complication of liver disease. In: Mark F, Bruce F. S, Marvin H, eds. S. Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. Vol 2. 6th ed. Philadelphia:WB Saunders, 1998;1334-1340.
2. Clausen M, Mortensen P. Lactulose, disaccharides and colonic flora. Clinical Consequences. Drugs 1997;53:930-942.
3. Weber F. Lactulose and combination therapy of hepatic encephalopathy: the role of the intestinal microflora. Dig Dis 1996;14:53-63.
4. Gillis J, Brogden R. Rifaximin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential in conditions mediated by gastrointestinal bacteria. Drugs 1995;49:467-484.
5. Conn H, Leevy C, Vlahcevic Z, Rodgers J, Maddrey W, Seeff L et al. Comparison of lactulose and neomycin in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. Gastroenterology 1977;72:573-583.
6. Conn H. Asterixis in non-hepatic disorders. Am J Med 1960;29:647-661.
7. Reitan R. Validity of the trail making test as an indicator of organic brain damage. Percept Motor Skills 1958;72:271-276.
8. Conn H. Trailmaking and number connection tests in the assessment of mental state in portal systemic encephalopathy. Am J Dig Dis 1977;22:541-550.
9. Wiliams R, James O, Warnes T, Morgan M. Evaluation of the efficacy and safety of rifaximin in the treatment of hepatic encephalopathy: a double-blind, randomized, dose-finding multe-centre study. Eur J Gastroenterol Hepatol 2000;12:203-208.
10. DiPiazza S, Gabriella, Filippazzo M, et al. Rifaximine versus neomycin in the treatment of portosystemic encephalopathy. Ital J Gastroenterol 1991;23:403-407.
11. Pedretti G, Calzetti C, Missale G, Fiaccadori F. Rifaximin versus neomycin on hyperammonemia in chronic portal systemic encephalopathy of cirrhotics. A double-blind, randomized trial. Ital J Gastroenterol 1991;23:175-178.
12. Massa P, Vallerino E, Dodero M. Treatment of hepatic encephalopathy with rifaximin: double-blind, double-dummy study versus lactulose. Eur J Clin Res 1993;4:7-18.
13. Bucci L, Palmieri G. Double-blind, double-dummy comparison between treatment with rifaximin and lactulose in patients with medium to severe degree hepatic encephalopathy. Curr Med Res Opin 1993;13:109-118.
14. Puxeddu A, Quartini M, Massimetti A, Ferrieri A. Rifaximin in the treatment of chronic hepatic encephalopathy. Curr Med Res Opin 1995;13:274-281.
15. Miglio F, Valpiani D, Rossellini S, Ferrieri A. Rifaximin, a non-absorbable rifamycin, for the treatment of hepatic encephalopathy. A double-blind, randomised trial. Curr Med Res Opin 1997;13:593-601.